



# Etude structure/fonction d'une proteine ABC : SUR, le récepteur des sulfonylurées

Fabienne Gally

## ► To cite this version:

Fabienne Gally. Etude structure/fonction d'une proteine ABC : SUR, le récepteur des sulfonylurées. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011848

**HAL Id: tel-00011848**

**<https://theses.hal.science/tel-00011848>**

Submitted on 8 Mar 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*Université Joseph Fourier –GRENOBLE 1*  
*UFR de BIOLOGIE*

**Thèse**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR ès SCIENCE DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
Discipline : Génie Biologique et Médical

présentée et soutenue publiquement  
par

***Fabienne GALLY***

Le 15 novembre 2005

---

**ETUDE STRUCTURE/FONCTION D'UNE PROTEINE ABC : SUR,  
LE RECEPTEUR DES SULFONYLUREES**

---

Directeur de thèse :  
M. Michel VIVAUDOU

Jury

Président : M. Alain FAVIER  
Rapporteur : M. Frédéric BECQ  
Rapporteur : M. Cyrille FORESTIER  
Examineur : M. André TERZIC  
Examineur : M. Jean-Marc VERBAVATZ



«La recherche est une école où l'on apprend l'importance du dialogue, de la confrontation des idées, du respect d'autrui. (...) La démarche scientifique n'est pas seulement porteuse d'espoir pour la compréhension du monde qui nous entoure, pour la solution des problèmes d'énergie, de santé, d'environnement auxquels nous sommes confrontés. Elle apporte aussi à ceux qui la pratiquent un enrichissement intellectuel et moral.»

Claude Cohen-Tannoudji



J'adresse mes remerciements à Florent Guillain pour son accueil au laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire et à Michel Vivaudou pour son encadrement au cours de ces quatre années.

Je remercie très sincèrement Frédéric Becq et Cyrille Forestier de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également très vivement André Terzic d'avoir accepté de traverser l'Atlantique pour examiner ce travail ainsi que Jean-Marc Verbavatz. et Alain Favier d'avoir accepté de faire partie et de présider ce jury.



# Table des matières

<b>Préambule</b>	<b>13</b>
<b>Introduction</b>	<b>17</b>
<b>1 Prédiction de structure</b>	<b>19</b>
1.1 Composition moléculaire	19
1.2 Stoechiométrie	19
1.3 Assemblage et trafic	20
<b>2 SUR, le récepteur des sulfonylurées appartient à la famille des transporteurs ABC</b>	<b>21</b>
2.1 Les transporteurs ABC : Une grande famille de protéines	22
2.2 Structures des protéines ABC	23
2.2.1 Organisation en domaines	23
2.2.1.1 Les domaines transmembranaires (TMD)	24
2.2.1.2 Les domaines de liaison des nucléotides (NBD)	24
2.2.1.3 Autres domaines	25
2.2.2 Données structurales	25
2.2.2.1 Structures des domaines de liaison des nucléotides	26
2.2.2.2 Structure de transporteurs complets	29
2.2.2.3 Conclusions	31
2.3 Mécanisme de transport	32
2.4 De nombreuses interrogations	33
<b>3 Kir6.x, canal potassique rectifiant entrant</b>	<b>35</b>
3.1 Quelques définitions d'électrophysiologie	35
3.2 Les différents canaux Kir	38
3.2.1 Propriétés des canaux Kir	38
3.2.1.1 Les différentes sous-familles	38
3.2.1.2 La rectification	38
3.2.1.3 Structure des canaux Kir	39
3.2.1.4 Régulation	40
3.2.1.5 Pathologies	42
3.2.2 Structure cristalline de canaux potassiques	44
<b>4 Identifications cellulaires</b>	<b>48</b>
4.1 Historique des clonages	49
4.2 Assemblage tissulaire	49
<b>5 Rôles physiologiques et pathologies</b>	<b>50</b>
5.1 Les canaux $K_{ATP}$ du pancréas	51
5.1.1 L'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante infantile (PHHI)	53
5.1.2 Le diabète	54
5.2 Les canaux $K_{ATP}$ du système nerveux central	55
5.3 Les canaux $K_{ATP}$ du système cardiovasculaire	56
5.3.1 Le myocarde	56
5.3.2 Le muscle squelettique	57
5.3.3 Le muscle lisse	58
5.4 Les canaux $K_{ATP}$ dans d'autres organes ou compartiments cellulaires	59
5.4.1 Le rein	59
5.4.2 La mitochondrie	60
5.4.3 Le noyau	60
5.4.4 Les cellules folliculaires	61
<b>6 Régulation</b>	<b>61</b>
6.1 Régulation physiologique	62
6.1.1 Nucléotides intracellulaires	62
6.1.1.1 Interaction avec Kir6.2	62



6.1.1.2	Interaction avec SUR	63
6.1.1.3	Coopération entre les deux NBD	65
6.1.1.4	Différences d'interaction avec les nucléotides entre les différents isoformes de SUR	66
6.1.2	Dinucléotides polyphosphates	67
6.1.3	Phospholipides	67
6.1.4	Phosphorylation	68
6.1.5	Sphingoglycolipides	68
6.1.6	Protéines G	69
6.1.7	Hormones	69
6.1.8	pH intracellulaire	69
6.1.9	Cytosquelette	70
6.1.10	Autres	70
6.2	Régulation pharmacologique	70
6.2.1	Inhibiteurs : les sulfonylurées et autres composés	71
6.2.2	Activateurs : les ouvreurs potassiques	73
<b>Matériel et méthodes</b>		<b>77</b>
<b>1</b>	<b>Biologie moléculaire</b>	<b>80</b>
1.1	Clones et vecteurs d'expression	80
1.2	Construction des plasmides	81
1.2.1	Splicing by Overlap Extension SOE	81
1.2.1.1	Assemblage des chimères : exemple des constructions SUR2A 1-1 et SUR2A 2-2	84
1.2.1.2	Cas particulier de la construction SUR2A 2-1	84
1.2.2	Mutagenèse dirigée	85
1.3	Amplification du matériel génétique	86
1.3.1	Transformation de bactéries compétentes	86
1.3.2	Amplification et purification de l'ADN plasmidique	87
1.4	Séquençage	87
1.5	Transcription in vitro	88
<b>2</b>	<b>Expression hétérologue des canaux <math>K_{ATP}</math></b>	<b>89</b>
2.1	Préparation des ovocytes	89
2.2	Injection de l'ARNm	91
<b>3</b>	<b>Caractérisation des protéines membranaires</b>	<b>92</b>
3.1	Contrôle de la production de protéines	92
3.1.1	Préparation des membranes	92
3.1.2	Western-blot	92
3.2	Contrôle de l'adressage des protéines à la membrane plasmique	93
3.3	Contrôle de la fonctionnalité des protéines	94
3.3.1	Le patch-clamp	94
3.3.1.1	Principe du patch-clamp	94
3.3.1.2	Instrumentation et poste de Patch-clamp	94
3.3.1.3	Les différentes configurations de patch-clamp	95
3.3.1.4	Les conditions expérimentales	97
3.3.1.4.1	Préparation de l'ovocyte	97
3.3.1.4.2	Microélectrode de mesure	98
3.3.1.4.3	Formation du « seal » et mesures de courant	98
3.3.2	Double électrode : TEVC (Two Electrode Voltage-Clamp)	99
3.3.2.1	Principe	99
3.3.2.2	Conditions expérimentales	100
<b>Sélectivité aux ouvreurs pharmacologiques</b>		<b>101</b>
<b>1</b>	<b>Position du problème</b>	<b>103</b>
<b>2</b>	<b>Résultats</b>	<b>104</b>
2.1	La thréonine 1253 de SUR2A n'est pas impliquée dans une liaison hydrogène avec l'ouvreur potassique	104
2.2	Rôle des résidus aromatiques de la 17 <sup>ème</sup> hélice transmembranaire dans l'activation par les ouvreurs potassiques	107

<b>3</b>	<b>Discussion</b>	<b>109</b>
3.1	La taille de la chaîne latérale des résidus SUR2A-T1253 et SUR1-M1290 est un facteur critique pour l'effet des ouvreurs potassiques	109
3.2	L'action des ouvreurs potassiques est modulée par les résidus aromatiques de la 17 <sup>ème</sup> hélice transmembranaire	110
<b>4</b>	<b>Conclusion</b>	<b>111</b>
	<b><i>Modulation des canaux <math>K_{ATP}</math> par les métaux lourds</i></b>	<b><i>113</i></b>
<b>1</b>	<b>Les métaux lourds et le vivant</b>	<b>115</b>
1.1	Quelques mots sur la physiologie du zinc	116
1.2	Quelques mots sur le cadmium	117
1.3	Les canaux $K_{ATP}$ et le zinc	117
1.4	Position du problème	118
<b>2</b>	<b>Résultats</b>	<b>119</b>
2.1	Test de fonctionnalité des mutants histidines H326 et H332	119
2.2	Effet du zinc intracellulaire sur les mutants histidines H326 et H332	120
2.3	Effet du DEPC sur l'activation par le zinc intracellulaire	122
2.4	Effet du cadmium intracellulaire sur les mutants histidines H326 et H332	123
2.5	Effet du cadmium et du plomb extracellulaires sur les canaux sauvages SUR1	124
<b>3</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>125</b>
	<b><i>Un domaine riche en acides aminés chargés négativement</i></b>	<b><i>129</i></b>
<b>1</b>	<b>Avant-propos</b>	<b>131</b>
<b>2</b>	<b>Position du problème</b>	<b>131</b>
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>133</b>
3.1	Inhibition par l'ATP	133
3.2	Blocage par le glibenclamide	135
3.3	Action des ouvreurs	136
3.4	Sensibilité à l'ADP	139
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>140</b>
4.1	Régulation du canal par l'ATP	140
4.2	Caractéristiques pharmacologiques des canaux mutants	141
4.3	Sensibilité à l'ADP	141
<b>5</b>	<b>Perspectives</b>	<b>142</b>
	<b><i>Interdépendance des domaines de liaison des nucléotides</i></b>	<b><i>145</i></b>
<b>1</b>	<b>Position du problème</b>	<b>147</b>
<b>2</b>	<b>Résultats</b>	<b>148</b>
2.1	Topologie des protéines SUR2A hybrides et mutantes	148
2.2	Expression des canaux hybrides	149
2.3	Régulation des canaux hybrides par les nucléotides	152
2.3.1	Sensibilité à l'ATP	152
2.3.2	Sensibilité à l'ADP	152
2.4	Régulation pharmacologique des canaux hybrides	155
2.5	Propriétés métaboliques des canaux hybrides	158
2.6	Propriétés pharmacologiques et nucléotidiques des canaux mutants	159
<b>3</b>	<b>Discussion</b>	<b>163</b>
	<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b><i>177</i></b>
	<b><i>Remerciements</i></b>	<b><i>203</i></b>



# Abréviations

<u>2-D</u>	deux dimensions
<u>ABC</u>	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
<u>ADN(c)</u>	Acide DesoxyriboNucléique (complémentaire)
<u>ADP</u>	Adénosine Di-Phosphate
<u>ApnA</u>	dinucléotides polyphosphates
<u>ARN(m)</u>	Acide RiboNucléique (messenger)
<u>ATP</u>	Adénosine Tri-Phosphate
<u>BtuCD</u>	transporteur de vitamine B12
<u>CFTR</u>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
<u>C-ter</u>	extrémité Carboxy terminale d'un peptide ou d'une protéine
<u>DEPC</u>	DiEthyl PyroCarbonate
<u>DNFB</u>	2-4-DiNitroFluoroBenzene
<u>ECM</u>	cryomicroscopie électronique
<u>EDTA</u>	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
<u>EGTA</u>	<i>Ethylene Glycol-bis-(<math>\beta</math>-aminoethylether)<i>N,N,N',N'</i>-Tetraacetic Acid</i>
<u>HisP</u>	transporteur d'histidine (NBD)
<u>ICD</u>	domaine intracellulaire
<u>K<sub>ATP</sub></u>	Canal potassique sensible à l'ATP
<u>KCO</u>	<i>K<sup>+</sup> Channel Opener</i> (ouvreuse potassique)
<u>KcsA</u>	canal potassique de <i>Streptomyces lividans</i>
<u>K<sub>d</sub></u>	constante de dissociation
<u>K<sub>i</sub></u>	constante d'inhibition
<u>K<sub>ir</sub></u>	<i>K<sup>+</sup> inward rectifier</i> (canal K <sup>+</sup> rectifiant entrant)
<u>K<sub>v</sub></u>	canal potassique voltage-dépendant
<u>K<sub>1/2</sub></u>	constante de demi inhibition
<u>LmrA</u>	exportateur de drogues
<u><math>\mu</math>M</u>	micromolaire 10 <sup>-6</sup>
<u>mM</u>	millimolaire 10 <sup>-3</sup>
<u>mV</u>	millivolt 10 <sup>-3</sup>

<u>MalK</u>	transporteur de maltose (NBD)
<u>MDR</u>	<i>MultiDrug Resistance</i> (résistance croisée aux médicaments)
<u>Mg</u>	Magnésium
<u>MRP</u>	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
<u>MsbA</u>	transporteur de lipide A
<u>NBD</u>	<i>Nucleotide Binding Domain</i> (domaine de liaison des nucléotides)
<u>N-ter</u>	extrémité amino terminale d'un peptide ou polypeptide
<u>P1075</u>	ouvreur potassique antihypertensif dérivé du pinacidil
<u>pA</u>	picoAmpère $10^{-12}$
<u>PCR</u>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<u>P-gp</u>	<i>P-glycoprotein</i>
<u>PHHI</u>	hypoglycémie hyperinsulinémique persistante de l'enfant
<u>Pi</u>	Phosphate inorganique
<u>PIP<sub>2</sub></u>	Phosphatidyl Inositol 4,5- <i>bis</i> Phosphate
<u>PIPES</u>	Piperazine-N, N'-bis-(acide 2-éthanesulfonique)
<u>PKA</u>	Protéine Kinase A
<u>PKC</u>	Protéine Kinase C
<u>Rad50</u>	facteur de transcription
<u>SBP</u>	<i>Substrate Binding Protein</i>
<u>SOE</u>	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
<u>SR47063</u>	ouvreur potassique antihypertensive derive du cromakalim
<u>SUR</u>	Récepteur des sulfonylurées
<u>TAP</u>	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
<u>TEM</u>	microscopie électronique à transmission
<u>TMD</u>	<i>TransMembrane Domain</i> (domaine transmembranaire)
<u>YCF1</u>	<i>Yeast Cadmium Factor 1</i>

# *Préambule*



Les membranes des cellules ne sont pas de simples barrières, elles permettent la communication entre le cytoplasme de la cellule et le milieu extracellulaire. La différence de composition entre le cytoplasme de la cellule et son milieu externe n'est possible que grâce à une perméabilité sélective de cette membrane plasmique. Les protéines membranaires représentent 10 % des gènes codant pour des protéines. Certaines de ces protéines sont des canaux ioniques ou des transporteurs passifs autorisant le passage de constituants selon leur gradient électrochimique. Cependant il existe des systèmes de transport actif (nécessitant de l'énergie) pour permettre le transport de substances contre leur gradient de concentration. Parmi ces transporteurs, la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) est la plus représentative : elle transporte une grande diversité de substrats et de nombreux gènes codent pour ces protéines.

Parmi les différentes classes de canaux ioniques présents dans les cellules excitables, les canaux potassiques sensibles à l'ATP (canaux  $K_{ATP}$ ), objets de notre attention, se distinguent par leur fonction – ils répondent aux variations du potentiel énergétique de la cellule – et par leur structure – ils sont formés de l'assemblage d'un pore ionique sélectif pour le potassium et d'un transporteur ABC, le récepteur des sulfonylurées SUR. Ce canal est actif au potentiel de repos de la cellule et participe ainsi à son maintien et à son contrôle. La modulation de son activité par le rapport ATP/ADP fait de ce canal un lien direct entre le métabolisme général de la cellule et les propriétés électriques de la membrane. Ce canal est le maillon essentiel des mécanismes de l'insulino sécrétion stimulée par le glucose, dans la cellule  $\beta$  du pancréas. Il est aussi un canal critique du contrôle de l'excitabilité du cœur et des neurones, ainsi que du tonus vasculaire, dont le rôle apparaît prépondérant lors d'une ischémie qui s'accompagne d'une baisse considérable du rapport ATP/ADP et de l'hyperpolarisation cellulaire. Cette place importante est renforcée par le fait que le canal est l'objet de régulations par les protéines G, le pH et par plusieurs kinases.

Ils sont physiologiquement bloqués par l'ATP intracellulaire et pharmacologiquement par les sulfonylurées (tolbutamide, glibenclamide...), substances hypoglycémiantes utilisées dans le traitement du diabète non insulino-dépendant. Ils sont activés par des molécules de structure hétérogène qui forment la famille des ouvreurs potassiques (K Channel Openers ou KCO).

Les récents développements de la biologie moléculaire permettent de caractériser et de cloner les gènes codant pour les canaux ou les transporteurs. Les méthodes et les



techniques de biochimie et surtout d'électrophysiologie cellulaire et moléculaire permettent d'en appréhender le fonctionnement et les rôles.

Ce couplage « naturel » entre un transporteur ABC et un canal ionique permet de comprendre plus aisément les relations structures fonctions des transporteurs ABC sans avoir besoin de faire appel aux manipulations lourdes de surexpression et de purification.

Ce travail de thèse a été consacré à l'étude de la structure/fonction de SUR, le récepteur des sulfonylurées. Nous avons, dans un premier temps, étudié la nature des acides aminés, localisés par de précédents travaux au sein du laboratoire au niveau de la dix-septième hélice transmembranaire, et impliqués dans la sensibilité aux ouvreurs pharmacologiques.

Par la suite, dans le cadre de l'étude de la pharmacologie moléculaire de la sous-unité SUR, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une zone très conservée et très riche en résidus glutamates située entre le domaine NBD1 et la dixième hélice transmembranaire. Cette zone regroupe 15 résidus chargés négativement (glutamates surtout, et quelques aspartates). De telles séquences sont également retrouvées chez d'autres protéines, mais leur rôle est incertain voire méconnu. Nous avons donc cherché à comprendre sa fonction au sein de cette sous-unité régulatrice du canal  $K_{ATP}$ .

Enfin, le canal étant sous le contrôle de ligands endogènes, notamment les nucléotides, et le récepteur SUR étant fortement homologue à d'autres transporteurs ABC, tels que la protéine CFTR, impliquée dans la mucoviscidose, ou la glycoprotéine P, responsable de la résistance aux médicaments anticancéreux, nous avons voulu aborder une question fondamentale sur les mécanismes de transport des protéines ABC eucaryotes, à savoir, quel est le rôle respectif de chacun des domaines de liaison des nucléotides NBD1 et NBD2 ? En effet les deux domaines NBD sont identiques dans la plupart des systèmes de transport bactériens mais ont divergé chez les organismes supérieurs. Cette divergence de séquence semble s'accompagner d'une divergence de fonction dont la raison demeure mal comprise.

Ce manuscrit rappelle tout d'abord dans un premier chapitre quelques données bibliographiques concernant les canaux  $K_{ATP}$ . Un second chapitre est consacré aux matériels et méthodes mis en œuvre pour tenter de répondre à nos diverses problématiques. Les chapitres suivants concernent la présentation et la discussion des résultats obtenus au cours de ces études. Enfin, le dernier chapitre permet de conclure et d'ouvrir des perspectives sur l'étude des transporteurs ABC et plus particulièrement du récepteur des sulfonylurées.

# *Introduction*



Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) sont des canaux potassiques rectifiant entrants qui sont inhibés par l'ATP et activés par le Mg-ADP. Leur structure est particulière, à savoir qu'il y a association d'un transporteur ABC (ATP-Binding-Cassette) et d'un canal potassique rectifiant entrant. Ils lient le métabolisme de la cellule au potentiel de membrane en mesurant les changements de concentration en nucléotides adénylés. Les canaux  $K_{ATP}$  jouent un rôle fonctionnel important dans de nombreux tissus incluant la cellule  $\beta$  pancréatique, le neurone, le muscle cardiaque, le muscle squelettique et le muscle lisse. Par exemple, leur activation conduit au raccourcissement du potentiel d'action cardiaque, à la relaxation du muscle vasculaire lisse, à l'inhibition de la sécrétion d'insuline ou à la libération de neurotransmetteurs.

## **1 Prédiction de structure**

### **1.1 Composition moléculaire**

Le canal  $K_{ATP}$  est un canal rectifiant entrant sélectif au potassium. Il adopte une structure tétramérique formée de 4 sous-unités Kir6.2 délimitant un pore entouré de 4 sous-unités SUR (Clement *et al.*, 1997). L'ensemble forme un complexe de 950 kDa environ (*Figure 1*). La présence des deux sous-unités est nécessaire pour que le canal soit fonctionnel (Inagaki *et al.*, 1995a). Leur association physique a été confirmée par co-immunoprécipitation (Lorenz et Terzic, 1999).

### **1.2 Stoechiométrie**

Kir6.2 s'assemble en tétramère, comme c'est le cas pour les autres canaux Kir (Clement *et al.*, 1997 ; Shyng et Nichols, 1997). La stoechiométrie des canaux  $K_{ATP}$  a pu être déterminée grâce à l'utilisation de tandem SUR1-Kir6.2 (Clement *et al.*, 1997 ; Inagaki *et al.*, 1997). La construction SUR1-Kir6.2 présente des propriétés similaires à celles des canaux natifs, indiquant qu'une stoechiométrie 1:1 est suffisante pour le fonctionnement du canal. Au contraire, la construction SUR1-Kir6.2-Kir6.2 ne produit pas de canaux fonctionnels, seule la co-expression de SUR1 permet de les restaurer. Ceci suggère que chaque sous-unité Kir6.2 requiert une sous-unité SUR. La structure octamérique du canal  $K_{ATP}$  a été confirmée par des études biochimiques qui montrent que la masse moléculaire du complexe est d'environ 950 kDa, ce qui correspond à quatre sous-unités SUR1 et quatre sous-unités Kir6.2 (Clement *et al.*, 1997) (*Figure 1*).

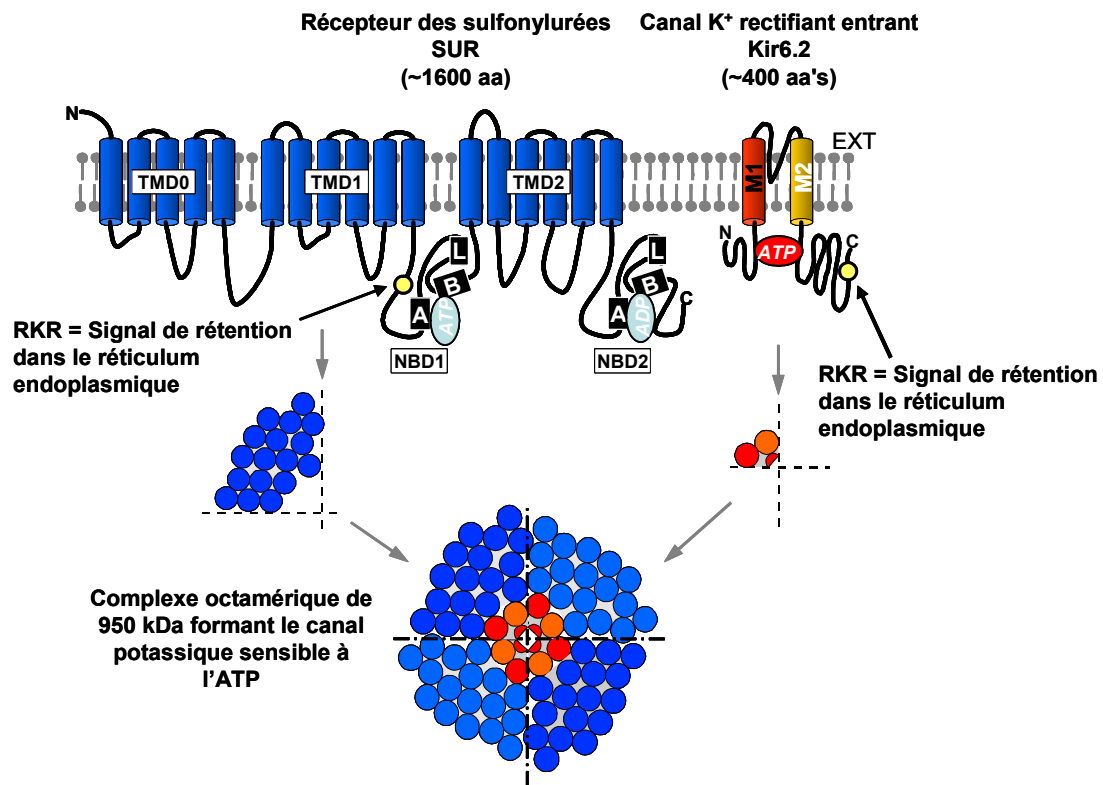
### 1.3 Assemblage et trafic

L'assemblage du canal *in vivo* n'est pas encore établi, mais une étude récente suggère que SUR1 interagisse rapidement et stabilise des monomères de Kir6.2 dans le réticulum endoplasmique et que le canal octamérique se forme préférentiellement à partir d'hétéromères (Crane et Aguilar-Bryan, 2004). De plus, le domaine N-terminal de SUR1 (ou TMD0) s'associe fortement à Kir6.2 et module son adressage et son ouverture (Chan *et al.*, 2003).

L'observation de Tucker *et al.* (1997) selon laquelle Kir6.2 tronqué en C-terminal produit des courants en absence de SUR s'explique par la présence en C-terminal d'une séquence de 3 acides aminés, RXR, qui agit comme un signal de rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (Zerangue *et al.* 1999). Ce signal, mis en évidence sur Kir6.2, ainsi que sur SUR (**Figure 1**), intervient à différentes étapes de l'assemblage des canaux K<sub>ATP</sub> et interagirait avec des dimères de protéine 14-3-3 (Yuan *et al.*, 2003). Il permet de restreindre l'expression membranaire des canaux à ceux de configuration octamérique.

L'assemblage hétérodimérique confirme l'idée qu'une interaction transitoire entre 14-3-3 et des dimères SUR/Kir6.x puisse être un facteur clef de la rétention au niveau du réticulum endoplasmique et du contrôle qualité des canaux natifs.

Par ailleurs, l'emploi de sulfonylurées (Yan *et al.*, 2004) ou la diminution de la température (Yang *et al.*, 2005) permet de rétablir la présence de canaux fonctionnels à la membrane plasmique alors que ceux-ci sont porteurs de mutations sur la sous-unité SUR1 qui empêchent leur association à Kir6.2 et donc leur bon adressage à la membrane.



**Figure 1 : Organisation structurale du canal  $K_{ATP}$**

Structure de Kir6.2 (~450 a.a.) de la famille des canaux rectifiant entrant et structure secondaire présumée de SUR (~1600 a.a.), le récepteur des sulfonylurées possédant 3 domaines transmembranaires (TMD0,1&2) et 2 domaines de liaison des nucléotides (NBD1&2) incorporant les séquences consensus Walker A, Walker B et Linker L (ou signature ABC). La présence de signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique au niveau des deux sous-unités permet de restreindre l'adressage membranaire aux canaux de configuration octamérique.

## 2 SUR, le récepteur des sulfonylurées appartient à la famille des transporteurs ABC

La protéine SUR appartient à la famille des protéines ABCC (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html>), au même titre que la protéine CFTR (dont certaines mutations provoquent la mucoviscidose), et la protéine MRP (impliquée dans la résistance croisée aux médicaments anti-cancéreux). SUR1 est exprimé dans les cellules  $\beta$  pancréatiques et le système nerveux. SUR2A et SUR2B, produits de l'épissage alternatif d'un même gène (Aguilar-Bryan *et al.* 1998), s'expriment respectivement dans le muscle strié et dans le muscle lisse. SUR2B présente 42 acides aminés en position C-terminale qui ressemblent davantage à ceux de SUR1.

Le gène SUR1 possède 39 exons. Il est localisé sur le bras court du chromosome 11. Il code pour une protéine de 1582 acides aminés (chez le hamster). Le gène SUR2 est localisé sur le chromosome 12 ; il possède 40 exons et code pour une protéine de 1545 acides aminés (chez le rat).

SUR est composé de 3 domaines transmembranaires composé chacun de 5, 6 et 6 hélices transmembranaires prédites selon des profils d'hydrophobicité (Raab-Graham *et al.*, 1999), et de 2 domaines cytoplasmiques, sites de liaison des nucléotides. Ces deux NBD (Nucleotide Binding Domain) possèdent des motifs consensus de liaison des nucléotides, Walker A et Walker B, ainsi qu'un motif signature ABC, une glutamine et une histidine conservées (souvent appelées Q-loop et H-loop respectivement). Les motifs A et B de Walker sont directement impliqués dans la liaison des nucléotides. Le motif ABC caractérise les protéines ABC, mais son rôle n'est pas totalement élucidé.

## **2.1 Les transporteurs ABC : Une grande famille de protéines**

Les transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) appartiennent à l'une des plus larges familles de protéines. On les rencontre chez toutes les espèces, de la bactérie à l'homme en passant par les plantes. 5 % du génome d'*Escherichia coli* code pour des transporteurs ABC (Linton et Higgins, 1998) et on en dénombre une cinquantaine chez l'homme (Dean *et al.*, 2001).

La plupart sont des transporteurs actifs : ils lient et transportent leur substrat à travers la membrane en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP contre le gradient de concentration du substrat.

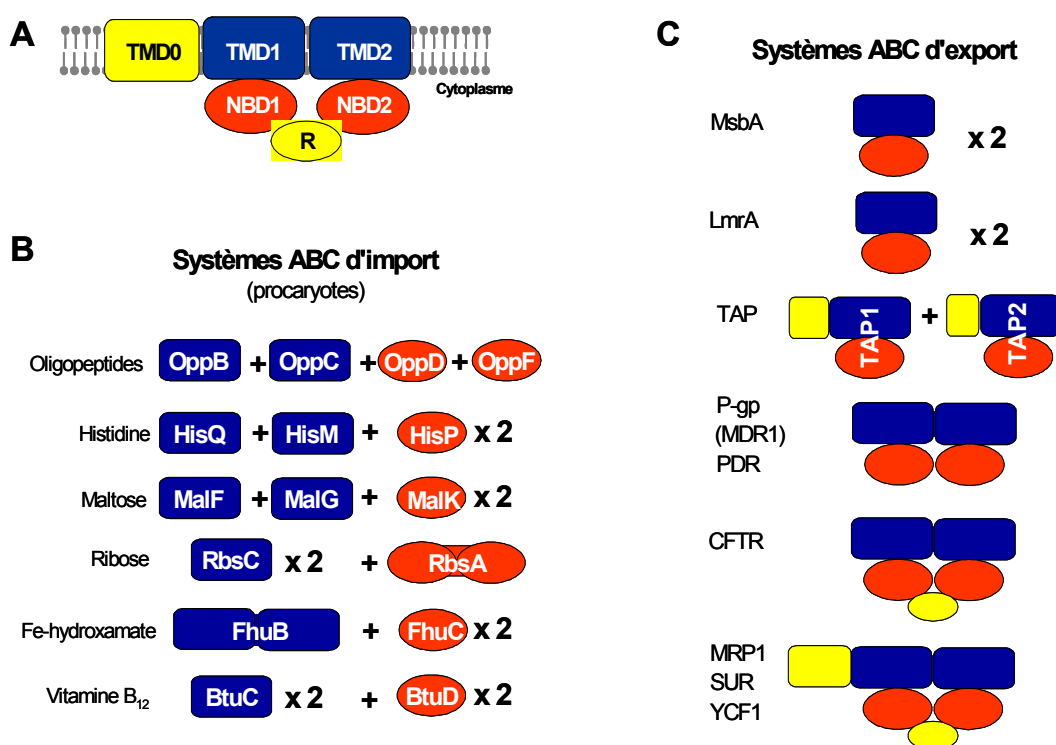
Ces protéines sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions...) mais également de substances toxiques (métaux lourds, drogues...). Elles se révèlent donc d'une importance toute particulière dans leur diversité de fonction. En effet, elles sont responsables de nombreux phénomènes de résistance (résistance aux antibiotiques, aux agents anti-fongiques, aux antiparasitaires, aux herbicides, ou aux anticancéreux). Chez l'homme, des mutations de gènes codant pour des transporteurs ABC sont la cause de certaines maladies génétiques. Citons à titre d'exemple la mucoviscidose (mutation de *cfr* ; Riordan *et al.*, 1989), la maladie de Tangier (mutation de *abcl* ; Rust *et al.*, 1999 ; Bodzioch *et al.*, 1999 ; Brooks-Wilson *et al.*, 1999), le syndrome de Dubin-Johnson (mutation de *mrp2* ; Paulusma *et al.*, 1996) ou la

maladie de Startgardt (mutation de *abca4* ; Allikmets *et al.*, 1997). Leur étude se révèle donc d'un intérêt tout particulier.

## 2.2 Structures des protéines ABC

### 2.2.1 Organisation en domaines

Les transporteurs ABC sont constitués de quatre domaines principaux, deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines de liaison des nucléotides (NBD). Ces quatre domaines peuvent être codés par un ou plusieurs polypeptides (*Figure 2*).



Non présenté : les protéines chaperonnes (PSB) OppA, HisJ, MalE, RbsB, FhuD, BtuF

**Figure 2 : Architecture modulaire des transporteurs ABC**

A) Un transporteur ABC comporte 4 domaines : 2 domaines transmembranaires (TMD bleus) et 2 domaines de liaison des nucléotides (NBD rouges). Des domaines optionnels (jaunes) existent chez certains transporteurs ABC, tels que les domaines régulateurs (R) ou un domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0). Ces domaines sont exprimés en sous-unités indépendantes comme cela est souvent le cas chez les procaryotes, ou en une seule chaîne polypeptidique plus fréquemment rencontrée chez les eucaryotes.

B) Exemples de transporteurs ABC d'import.

C) Exemples de transporteurs ABC d'export.



*TMD : TransMembrane Domain / NBD : Nucleotide Binding Domain / R : Regulator / MsbA : transporteur de lipide A / LmrA : exporteur de drogues / TAP : Transporter associated with Antigen Processing / P-gp : P-glycoprotéine ou MDR : MultiDrug Resistance / CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator / MRP : Multidrug Resistance Protein / SUR : SulfonylUrea Receptor / YCF : Yeast Cadmium Factor*

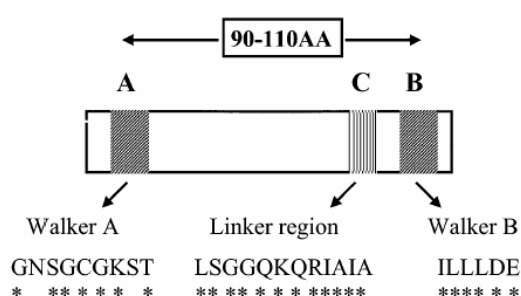
### 2.2.1.1 Les domaines transmembranaires (TMD)

Les deux TMD traversent plusieurs fois la membrane via des hélices  $\alpha$ . Typiquement, il y a six hélices par domaine, soit un total de douze hélices par exportateur. Des variations dans cette formule peuvent refléter des fonctions auxiliaires de ces hélices, telle que l'insertion membranaire ou l'activité importatrice du transporteur.

Chez certains transporteurs, tels que la P-gp ou CFTR, les TMD seuls forment le pore membranaire ; alors que chez d'autres transporteurs, tels que des translocons de protéine, des protéines additionnelles peuvent être impliquées. Cependant il semblerait, notamment pour la P-gp, qu'il existe plusieurs sites de liaison du substrat.

### 2.2.1.2 Les domaines de liaison des nucléotides (NBD)

Les NBD sont hydrophiles et interagissent avec les boucles intracellulaires des TMD. Ils comprennent les séquences consensus : la signature ABC qui permet de les identifier mais aussi les motifs A et B de Walker (**Figure 3**). Il est important de noter que la conservation de ces domaines permet de définir et de délimiter la famille.



**Figure 3 :** Schéma illustrant les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD). Les motifs A et B de Walker sont distants de 90 à 110 acides aminés. La signature ABC précède le motif B de Walker. Les acides aminés les plus conservés chez les transporteurs ABC de mammifères de la famille MDR sont indiqués au-dessous des motifs consensus.

(Gottesman et Ambudkar, 2001)

Plusieurs structures cristallines de ces NBD ont été déterminées et présentent toutes un repliement très similaire. Cependant l'interprétation des données cristallographiques diffère significativement quant à l'assemblage oligomérique des NBD.

### **2.2.1.3 Autres domaines**

Beaucoup de transporteurs ABC présentent des domaines auxiliaires qui ont des fonctions spécifiques. Chez les systèmes d'import bactériens, des protéines de liaison du substrat (SBP : Substrat Binding Protein) assurent la spécificité et l'unidirectionnalité du transport.

D'autres transporteurs ABC ont des domaines additionnels intrinsèques. Citons par exemple le domaine de régulation R de la protéine CFTR ou le troisième domaine transmembranaire en N-terminal (TMD0) de la plupart des transporteurs de la sous-famille ABCC (*Figure 2*).

## **2.2.2 Données structurales**

Pour comprendre le mécanisme par lequel les protéines ABC transportent leur substrat à travers les membranes cellulaires, des données structurales sont essentielles. Ces données sont difficiles à obtenir. Ceci est essentiellement dû à la difficulté de surexprimer et de purifier ces protéines dans une forme active. Comme pour beaucoup de protéines membranaires, les transporteurs ABC sont souvent toxiques pour la cellule ou mal repliés lorsqu'ils sont surexprimés et ils perdent souvent leur activité lorsqu'ils sont purifiés. D'autant plus que l'activité de certains transporteurs est influencée par leur environnement membranaire. Il semble aussi que les domaines transmembranaires (TMD) soient très flexibles, ce qui n'aide pas à la cristallisation.

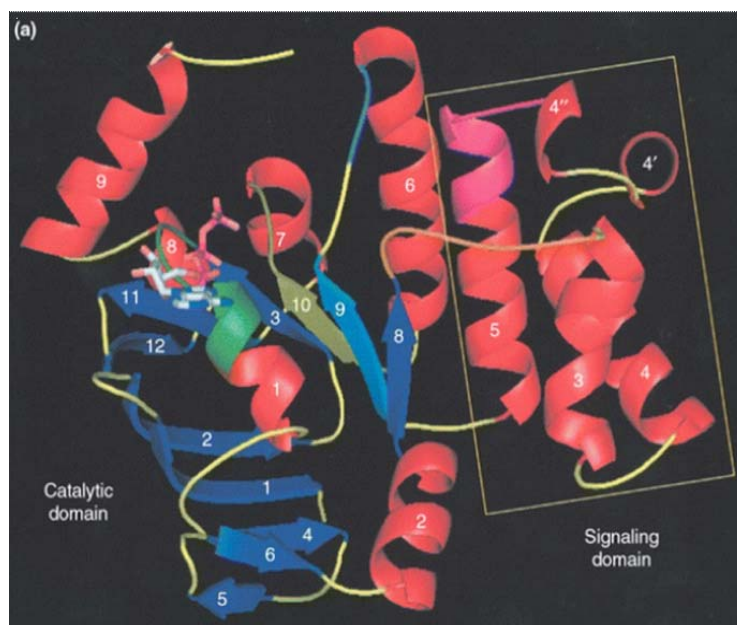
Des données structurales ont peu à peu émergé grâce à différentes approches. Beaucoup de transporteurs ABC bactériens sont des complexes multi-protéiques dont les quatre sous-unités sont codées par des polypeptides séparés (*Figure 2*). Certains domaines de liaison des nucléotides (NBD) ont pu être ainsi surexprimés, purifiés et caractérisés par cristallographie de rayons X à une forte résolution. Même si de telles données sont intéressantes pour les interactions avec l'ATP, elles ont peu d'impact sur notre compréhension du mécanisme de transport. La liaison du substrat est en effet une propriété des TMD, et le transport requiert l'interaction des quatre domaines. Les premières données structurales pour un transporteur complet proviennent d'analyses de simples particules en microscopie électronique et de données cristallographiques. On dispose ainsi de la

structure à faible résolution de trois transporteurs ABC de mammifères : la P-glycoprotéine à 25 Å par microscopie électronique à transmission (TEM) de simples particules et à 10 Å par cryomicroscopie électronique (ECM) de cristaux à deux dimensions (2-D) (Rosenberg *et al.*, 1997 & 2001) ; MRP1 à 22 Å de résolution par TEM et cristaux 2-D (Rossenberg *et al.*, 2001) ; et TAP à une résolution de 35 Å (Velarde *et al.*, 2001). Les deux seules données structurales par cristallographie de rayons X de transporteurs complets proviennent du transporteur de lipide A (MsbA) (Chang et Roth, 2001 ; Chang, 2003 ; Reyes et Chang, 2005) et du transporteur de vitamine B12 (BtuCD) (Locher *et al.*, 2002) d'*Escherichia coli*.

### 2.2.2.1 Structures des domaines de liaison des nucléotides

Toutes les structures des NBD présentent une architecture semblable (**Figure 4**). Elles comprennent deux bras orientés perpendiculairement l'un à l'autre (en forme de L). Le bras I (domaine catalytique), essentiellement en feuillets  $\beta$ , comprend les motifs A et B de Walker, le bras II (domaine signalétique), en hélices  $\alpha$ , contient le motif signature ABC. Les deux autres motifs consensus, Q-loop et H-loop, se situent à l'interface des deux bras.

**Figure 4 :** Conservation de la structure des NBD. Exemple de la structure de HisP : les hélices sont représentées en rouge, les feuillets en bleus et l'ATP en représentation « ball-and-stick ». Les motifs consensus sont colorés : en vert le Walker A, en orange la Q-loop, en rose la signature ABC, en cyan le Walker B, en vert-gris la H-loop. Les domaines catalytique et signalétique se distinguent par l'encadrement de ce dernier.



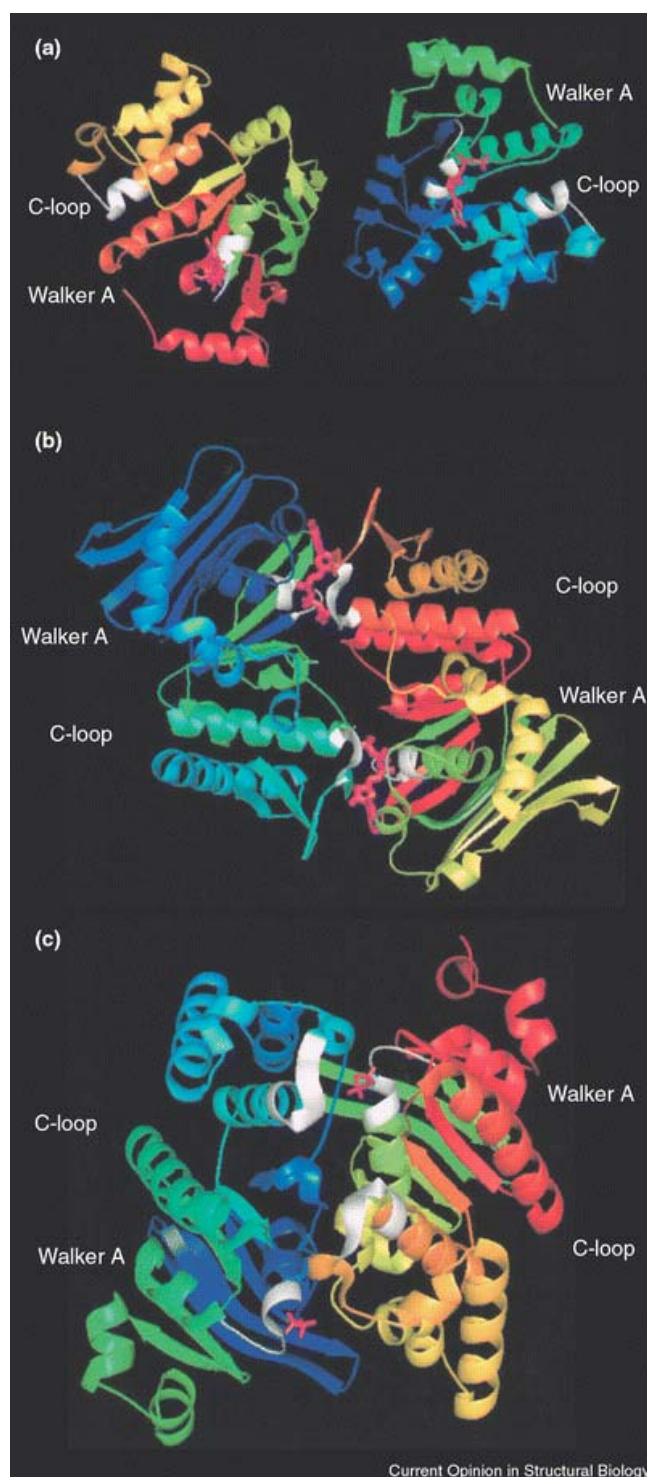
(Schmitt et Tampe, 2002)

Les données structurales ont été obtenues avec des assemblages de monomères de NBD isolés. Cependant il semble que les deux NBD soient nécessaires au fonctionnement du transporteur (Azzaria *et al.*, 1989 ; Gill *et al.*, 1992). Dans le modèle de cycle catalytique alternatif, seule une molécule d'ATP est hydrolysée, avec une activité ATPase qui alterne entre les NBD (Hrycyna *et al.*, 1999 ; Senior et Gadsby, 1997). De plus, n'omettons pas la possibilité que les deux NBD puissent s'influencer l'un l'autre, soit indirectement via les TMD, soit directement en interagissant. Il est donc intéressant de voir que certains des cristaux de NBD ont cristallisé sous forme d'assemblage en dimères (Kerr, 2002).

Trois modèles de dimères ont été présentés (**Figure 5**). Dans la structure cristalline de HisP, le dimère adopte une configuration dos à dos, dans laquelle les domaines interagissent l'un avec l'autre via leurs feuilletts  $\beta$  du bras I. Le bras II et la séquence ABC interagissent avec les TMD, HisQ et HisM (Hung *et al.*, 1998). Dans cette configuration les sites de liaison de l'ATP sont exposés et les motifs signature sont trop loin pour interagir avec le nucléotide. L'interface du dimère de Rad50 est très différente. Ici, le site de liaison du nucléotide est localisé à l'interface et formé par les motifs A et B de Walker du premier monomère et de la signature ABC du deuxième, ce qui résulte en une orientation tête-bêche du dimère (Hopfner *et al.* 2000). Enfin, l'interface de MalK adopte une orientation tête à tête avec un maximum de surface enfouie (Diederichs *et al.*, 2000).

**Figure 5 :** Différentes interfaces de dimères proposées pour les NBD. (a) Dimère dos-à-dos de HisP. (b) Dimère tête-bêche de Rad50. (c) Dimère tête-à-tête de MalK. Pour simplifier, le domaine régulateur de MalK a été omis. Les motifs Walker A et C-loop sont figurés en blanc. Les ligands sont en représentation "ball-and-stick".

(Schmitt et Tampe, 2002)



D'autres structures de NBD ont été rapportées : MJ1267 (Karpowich *et al.*, 2001), MJ0796 (Yuan *et al.*, 2001) et TAP1 (Gaudet et Wiley, 2001) mais n'ont pas résolu les discussions sur la nature de l'interface des dimères. Il faut attendre deux publications sur un éventuel domaine ABC de *Methanococcus janaschii* (MJ0796 et MJ1267). Ces deux cassettes présentent les mêmes propriétés : la mutation du glutamate en glutamine

immédiatement en C-ter du Walker B induit la formation de dimères stables liés à l'ATP, mais la protéine est incapable d'hydrolyser l'ATP (Smith *et al.*, 2002 ; Moody *et al.*, 2002). Dans la structure cristalline, le dimère adopte une interface identique à celle de Rad50. Cette structure est confirmée par des données biochimiques obtenues pour MalK (Fetsch et Davidson, 2002). De plus il semble établi que l'hydrolyse de l'ATP soit un processus coopératif dans lequel les résidus clés de chaque monomère participent à la liaison de l'ATP, formant ainsi une interface dimérique avec une orientation tête-bêche.

Plus récemment, la structure du NBD1 de CFTR a été résolue (Lewis *et al.*, 2004). Ce NBD1 possède un segment régulateur supplémentaire, une interconnexion entre les domaines raccourcie et une conformation du nucléotide inhabituelle, ce qui le différencie des autres NBD. De plus, le NBD1 isolé ne présente pas d'activité ATPase et sa structure semble indépendante de l'état de liaison. La phénylalanine 508, qui est communément délétée dans les cas de mucoviscidose, est exposée à une éventuelle interface TMD-NBD.

#### **2.2.2.2 Structure de transporteurs complets**

Deux structures de transporteurs complets ont été rapportées :

- MsbA, la lipide A flipase d'*Escherichia coli* (Chang et Roth, 2001),
- BtuCD, l'importateur de vitamine B12 d'*Escherichia coli* (Locher *et al.*, 2002).

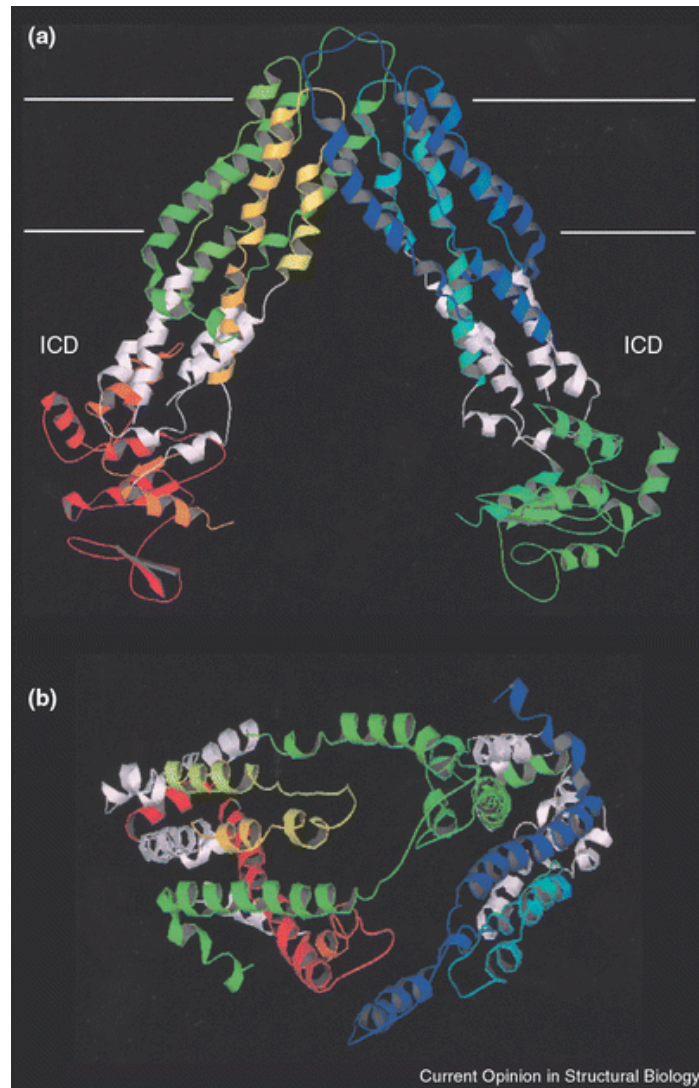
Dans les deux cas, les cristaux ont été obtenus en absence de substrat et de nucléotide mais apparaissent sous forme de dimères.

Outre la présence de dix hélices transmembranaires au niveau des TMD de BtuCD, les deux structures diffèrent au niveau des interactions entre TMD et NBD.

Chez MsbA (**Figure 6**), un troisième domaine a été identifié. Il est appelé domaine intracellulaire (ICD) et se compose d'hélices  $\alpha$  localisées entre le TMD et le NBD. Cet ICD agirait comme une unité de transduction faisant la liaison entre TMD et NBD au cours de la liaison du substrat ou des nucléotides.

**Figure 6:** La flipase de lipide A d'*Escherichia coli*. (a) Structure de MsbA. La région ICD est figurée en blanc. Les traits blancs représentent la membrane. (b) Vue de haut de MsbA. Les NBD ont été omis pour mettre en évidence l'arrangement des hélices transmembranaires.

(Schmitt et Tampe, 2002)

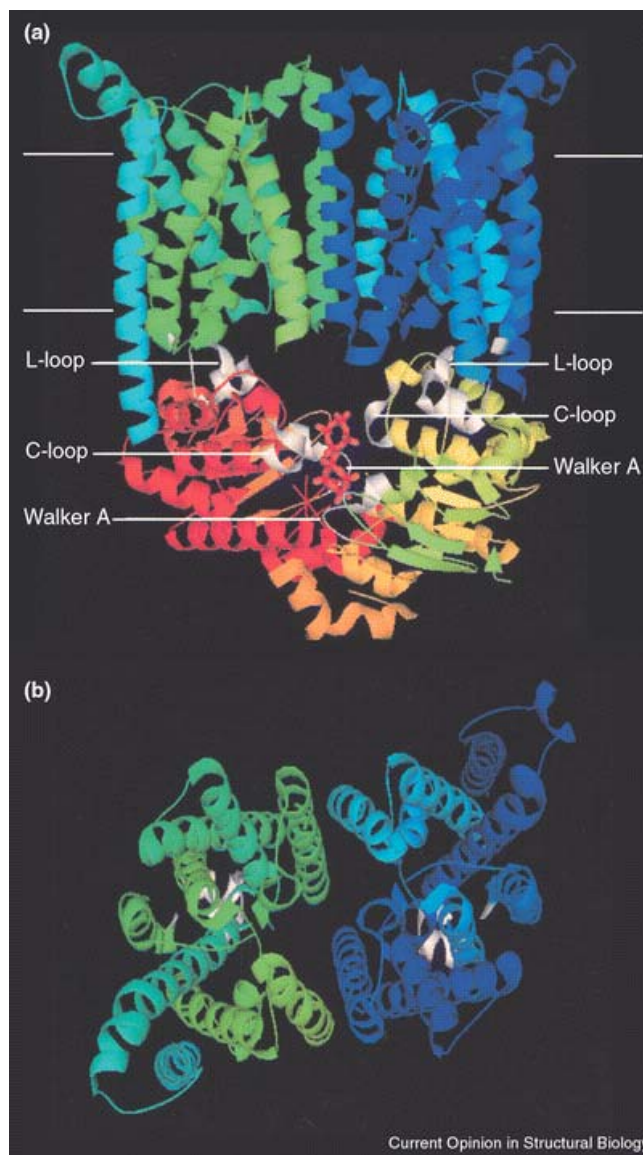


Chez BtuCD (**Figure 7**), contrairement à MsbA, aucun ICD n'a été identifié. Les NBD sont en contact direct avec les TMD, via une boucle cytoplasmique, localisée entre les hélices transmembranaires 6 et 7. Cette boucle se replie en deux courtes hélices  $\alpha$  qui forment un L (L-loop). La séquence de cette boucle coïncide avec le motif EAA de nombreux transporteurs ABC bactériens (Mourez *et al.*, 1997), reconnu pour intervenir dans la communication entre les TMD et NBD.



**Figure 7 :** L'importateur de vitamine B12 d'*Escherichia coli*. (a) Structure de BtuCD. Les motifs Walker A, C-loop et L-loop (zone de contact entre TMD et NBD) sont indiqués et figurés en blanc. Les traits blancs indiquent la position de la membrane. Le ligand, cyclotetranadate, est présenté en représentation « ball-and-stick ». (b) Vue de haut de BtuCD. Pour simplifier, les NBD (BtuD) ont été omis.

(Schmitt et Tampe, 2002)



### 2.2.2.3 Conclusions

Beaucoup de mutations chez les transporteurs ABC humains tels que CFTR ou TAP, responsables de maladie, sont localisées dans les régions des domaines ABC qui interagissent avec la L-loop. La communauté scientifique s'accorde à penser que les NBD forment un dimère tête-bêche.

En se basant sur les deux structures de transporteurs ABC complets, il semble déjà évident que la structure et la disposition des TMD varient d'un transporteur à l'autre et que, non seulement la spécificité du substrat, mais aussi sa nature chimique (hydrophobe ou hydrophile par exemple), impose certaines contraintes sur les TMD et doit influencer leur réarrangement. Il est possible que les transporteurs ABC ayant une fonction d'import

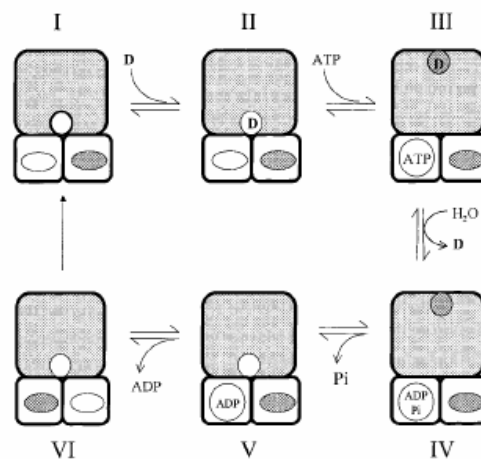


adoptent une architecture en L-loop et ceux ayant une fonction d'export utilisent les ICD pour communiquer entre TMD et NBD.

## 2.3 Mécanisme de transport

Une image du mécanisme par lequel ces protéines transportent leur substrat à travers la membrane émerge de toutes les études portant sur les transporteurs. Le transport implique d'importants changements conformationnels et l'hydrolyse de l'ATP (**Figure 6**).

Le cycle du transport est initié par l'interaction du substrat avec un site de liaison spécifique au niveau des TMD. Cette liaison induit un changement conformationnel des TMD, qui est transmis aux NBD pour qu'ils lient l'ATP. Il semblerait que ce soit la liaison (et non l'hydrolyse) de l'ATP qui induise d'importants changements conformationnels responsables de l'altération de l'affinité et de l'orientation du site de liaison du substrat de telle sorte que le substrat soit relargué de l'autre côté de la membrane (Martin *et al.*, 2001). L'hydrolyse de l'ATP et le relargage de l'ADP et du  $P_i$  permettent de restaurer le transporteur dans sa conformation initiale pour initier un nouveau cycle (Sauna et Ambudkar, 2000). Les deux NBD lient et hydrolysent l'ATP, ce qui laisse suggérer un mécanisme alternatif du cycle catalytique (Senior *et al.*, 1995). Cependant, certaines zones d'ombre demeurent. Y a-t-il hydrolyse d'une ou de deux molécules d'ATP par molécule de substrat transportée ? La détermination de ce nombre, ainsi que la détermination exacte du nombre de sites de liaison du substrat et la nature des changements conformationnels, est cruciale pour élucider complètement le mécanisme de transport.



**Figure 8 :** Modèle du transport de drogues par la P-gp. Les deux TMD sont représentés par le grand carré gris, les deux NBD par de petits carrés blancs. Le site catalytique de chaque NBD est représenté par une ellipse ; une ellipse blanche représente une conformation ouverte, une ellipse grisée une conformation fermée.

- I. Le cycle du transport est initié par l'interaction du substrat avec un site de liaison spécifique au niveau des TMD.
- II. Cette liaison induit un changement conformationnel des TMD, qui est transmis aux NBD pour qu'ils lient l'ATP.
- III. Il semblerait que ce soit la liaison (et non l'hydrolyse) de l'ATP qui induise d'importants changements conformationnels.
- IV. Ces changements conformationnels sont responsables de l'altération de l'affinité et de l'orientation du site de liaison du substrat de telle manière que le substrat est relargué de l'autre côté de la membrane.
- V. L'hydrolyse de l'ATP et le relargage de l'ADP et du Pi permettent de restaurer le transporteur dans sa conformation initiale pour initier un nouveau cycle.
- VI. Le transporteur retrouve son état initial.

(Martin *et al.*, 2001)

## 2.4 De nombreuses interrogations

D'autres interrogations concernent la nécessité des deux domaines ABC. Tous les transporteurs ABC ont deux NBD et peuvent lier, à priori, deux ATP. Dans les études d'inhibition du transporteur de maltose par le vanadate, seulement l'un des deux sites est occupé (Chen *et al.*, 2001). La même observation a été faite chez MDR1 (Senior *et al.*, 1995), et il semble que MDR1 (Senior, 1998 ; Shapiro et Ling, 1998) et LmrA (van Ven *et al.*, 2000) - son homologue bactérien (van Ven *et al.*, 1998) - agissent de façon alternative. Mais ce mécanisme séquentiel doit être clarifié. On ne sait pas comment le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP est choisi. Ceci est encore plus intrigant chez les protéines ABC possédant deux NBD identiques. Dans la structure de BtuCD les deux NBD se font face ce qui implique qu'il y ait une communication entre les deux domaines parce que la protéine a été cristallisée en absence d'ATP. Dans la structure sans nucléotide de MsbA cependant, les NBD sont distants de plus de 50 Å. D'un autre côté, des transporteurs ABC tels que SUR, CFTR ou TAP contiennent des signatures ABC dégénérées dans l'un des deux NBD. Cette observation implique que seul un des deux NBD soit fonctionnel, et que l'autre ait

des fonctions régulatrices. La publication de la structure de MDR1 (Rosenberg *et al.*, 2001) suggère que la liaison de l'ATP induise des changements de conformations majeurs au niveau des TMD. Mais on ne sait toujours pas comment la non équivalence des NBD survient, comment les deux domaines communiquent entre eux ni à quelle étape le transport du substrat a lieu.

Une autre question clef est la localisation et la nature du site de fixation du substrat. Aucune des structures cristallines n'a été obtenue en présence du substrat. Certains transporteurs ABC, tel que le transporteur de maltose ou l'histidine perméase transportent spécifiquement leurs substrats respectifs, alors que d'autres tels que MDR1 ou TAP transportent une large variété de substrats. MDR1 est capable d'exporter presque tous les anticancéreux connus du feuillet interne de la membrane plasmique à l'espace extracellulaire, ceci pose donc un gros problème pour les thérapies. TAP est capable de transporter des peptides de 8 à 40 acides aminés du cytosol à la lumière du réticulum endoplasmique. Comme pour MDR1, TAP reconnaît une large variété de substrats. Même si les sites de liaisons de MDR1 et TAP ont été cartographiés par pontage bifonctionnel et autres approches biochimiques, comment une simple protéine peut choisir parmi une myriade de ligands sans perdre son affinité, sa spécificité ou son efficacité reste un mystère.

Le mécanisme de transport du substrat reste controversé. Dans le cas de MDR1, il est prouvé que deux sites de liaison du ligand, l'un avec une haute affinité, l'autre avec une plus faible, existent au niveau des TMD. Deux modèles proposent que les NBD agissent de manière alternée. Dans un de ces modèles (Senior, 1998), le transport du site de liaison le plus affiné au moins affiné se fait par dissociation du Pi de l'un des NBD. La dissociation représente la relaxation du NBD d'un niveau énergétique élevé à un niveau plus faible. L'autre modèle propose que deux molécules se lient simultanément et que l'hydrolyse de l'ATP apporte l'énergie nécessaire à la dissociation des molécules (Shapiro et Ling, 1998). Le laboratoire d'Ambudkar (Sauna et Ambudkar, 2001) propose un modèle où les sites de l'ATP sont choisis de façon aléatoire. Après liaison de l'ATP sur un site, l'affinité de l'autre site diminue, ainsi un seul NBD agit à la fois. Le substrat passe du site de haute affinité à celui de basse affinité avec l'hydrolyse de l'ATP. Après dissociation de l'ADP, qui restaure la haute affinité de l'autre site de liaison de l'ATP, l'ATP peut se lier à l'autre NBD. L'hydrolyse de ce second ATP est utilisée pour restaurer le transporteur. Il a été démontré que la fixation du substrat, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sont étroitement

liées ; cependant le modèle alternatif implique que deux molécules d'ATP soient hydrolysées par molécule transportée.

### 3 ***Kir6.x, canal potassique rectifiant entrant***

Un canal rectifiant entrant (Kir) favorise le flux d'ions entrant par rapport au flux d'ions sortant. Dans la sous-famille Kir6, il existe deux isoformes : Kir6.1 et Kir6.2 (Inagaki *et al.*, 1995b, 1995c ; Sakura *et al.*, 1995a, 1995b). Les deux isoformes ont des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques, deux segments transmembranaires reliés par une boucle H5 qui possède la séquence signature des canaux potassiques (Gly-Tyr-Gly ou Gly-Phe-Gly). Le gène codant Kir6.2 semble apparié à celui de SUR1, puisqu'il le suit immédiatement sur le chromosome 11 (Inagaki *et al.*, 1995b). Les gènes de Kir6.1 et de SUR2 sont localisés sur le chromosome 12 (Chutcow *et al.*, 1996).

La protéine Kir6.2 est principalement exprimée dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, la protéine Kir6.1 s'exprime dans le muscle lisse.

D'autre part, des protéines Kir6.2 tronquées en C-terminal ( $\Delta C26$  ou  $\Delta C36$ ) exprimées dans des ovocytes de Xénope, produisent des canaux  $K_{ATP}$  fonctionnels en l'absence de SUR (Tucker *et al.* 1997). Ces protéines tronquées restent sensibles à l'ATP et possèdent donc un site de liaison à l'ATP. Des études par mutagenèse ont permis de localiser les régions liant l'ATP, au niveau des parties intracellulaires de Kir6.2 jouxtant les 2 hélices transmembranaires (Tucker *et al.* 1998). Il est désormais admis que l'ATP se lie sur des sites formés de la partie C-ter d'une sous-unité Kir6.2 et de la partie N-ter de la sous-unité adjacente (Trapp *et al.*, 2003 ; Ribalet *et al.*, 2005).

#### 3.1 **Quelques définitions d'électrophysiologie**

Avant de parler de canaux ioniques de façon plus approfondie, il est nécessaire de donner quelques définitions qui trouveront leur importance dans la compréhension de ce qui va suivre.

Dans les cellules eucaryotes, la distribution des ions de part et d'autre de la membrane est inégale : les ions  $K^+$  sont concentrés à l'intérieur de la cellule avec des ions non perméants (trop volumineux pour traverser les canaux ioniques), tandis que les ions  $Na^+$ ,  $Cl^-$  et  $Ca^{2+}$  sont concentrés à l'extérieur (**Tableau 1**).

	Concentration intracellulaire	Concentration extracellulaire
K <sup>+</sup>	140 mM	3,5 à 5 mM
Na <sup>+</sup>	5 à 15 mM	135 à 145 mM
Cl <sup>-</sup>	5 à 15 mM	110 mM
Ca <sup>2+</sup>	0,1 µM	1 à 2 mM

**Tableau 1 :** Concentrations intracellulaires et extracellulaires des ions les plus représentatifs d'une cellule de mammifère.

Ces gradients de concentration gouvernent les transferts ioniques passifs par diffusion. Le déséquilibre des charges, résultant d'un transport de charges d'un côté à l'autre, entraîne la formation d'une différence de potentiel électrique à travers la membrane : le **potentiel de membrane** ( $E_m$ ). Il correspond à la différence entre le potentiel de la face interne et le potentiel de la face externe.

$$E_m = V_{\text{int}} - V_{\text{ext}}$$

Le **potentiel membranaire de repos** correspond au potentiel d'équilibre de la cellule lorsque aucun courant ne traverse la membrane.

L'application d'un potentiel moins négatif dépolarise la membrane, on parle de **dépolarisation membranaire**, alors que l'application d'un potentiel plus négatif l'hyperpolarise, on parle d'**hyperpolarisation membranaire**.

Le **potentiel électrochimique d'équilibre d'un ion** est défini par la **loi de Nernst** :

$$E_{\text{ion}} = (RT/zF) \cdot \ln[\text{ion}]_e / [\text{ion}]_i$$

$E_{\text{ion}}$  : potentiel d'équilibre de l'ion

R : constante des gaz parfaits

T : température absolue

z : valence de l'ion

F : constante de Faraday

$[\text{ion}]_e$  : concentration extracellulaire de l'ion

$[\text{ion}]_i$  : concentration intracellulaire de l'ion

La valeur du potentiel de membrane  $E_m$  dépend des potentiels d'équilibre de tous les ions perméants et donc des concentrations relatives des ions présents de part et d'autre de la membrane. Si une conductance ionique domine, le potentiel de repos est proche du potentiel de Nernst de cet ion. La membrane étant plus perméable au  $K^+$  qu'au  $Na^+$ , au  $Ca^{2+}$  ou au  $Cl^-$ , le potentiel de repos de la cellule est proche du potentiel de Nernst du  $K^+$ . Du fait de son épaisseur (3 nm en moyenne), la membrane se comporte comme un condensateur de capacité  $C$ , capable d'accumuler des charges à chaque variation de potentiel.

$$C = Q/\Delta V$$

(avec une capacité d'autant plus importante que la surface de la membrane est grande.)

Quand un courant est appliqué, le condensateur membranaire se charge et le potentiel change (courants capacitifs d'intensité  $I = C.\Delta V/\Delta t$ ). Le canal ionique ouvert peut être assimilé à une résistance  $R$ . Dans ce cas on parle plutôt de conductance ( $\gamma = 1/R$ ) pour exprimer la facilité avec laquelle un ion traverse un canal. La conductance est définie par la Loi d'Ohm

$$I = \gamma.E$$

Cette relation peut être appliquée à un ion en particulier. L'intensité  $i$  traduit alors la facilité avec laquelle l'ion traverse le canal.

$$i_{ion} = \gamma_{ion}.(E_m - E_{ion})$$

$\gamma_{ion}$  : conductance du canal

$E_m$  : potentiel de membrane

$E_{ion}$  : potentiel d'équilibre de l'ion

$E_m - E_{ion}$  : force électromotrice appliquée à l'ion (« driving force »)

Soit pour la totalité des canaux d'une cellule

$$I_{ion} = g_{ion}.(E_m - E_{ion})$$

$g_{ion}$  : conductance pour l'ion de l'ensemble des canaux de la cellule.

On parle alors de courants macroscopiques.

Par convention un **courant entrant** correspondant à un influx de cations (ou un efflux d'anions) est négatif et un **courant sortant** correspondant à un efflux de cations (ou un influx d'anions) est positif. En conséquence un courant entrant est dépolarisant et inversement un courant sortant est hyperpolarisant.

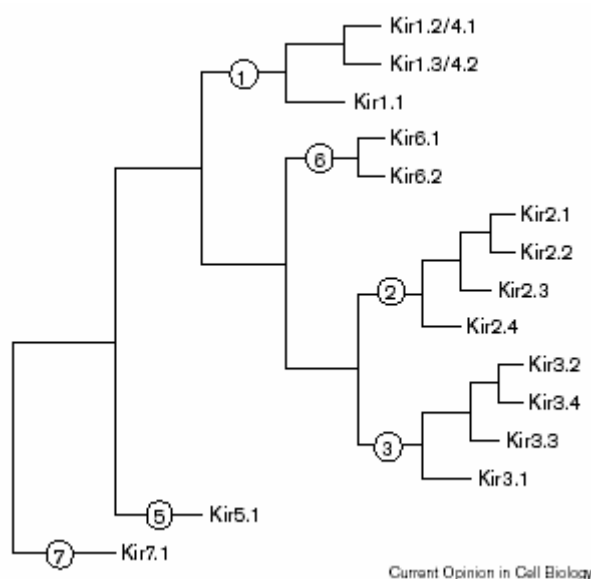
## 3.2 Les différents canaux Kir

### 3.2.1 Propriétés des canaux Kir

Les canaux potassiques à rectification entrante (Kir) ont deux principaux rôles physiologiques : ils stabilisent le potentiel membranaire de repos proche du potentiel d'équilibre du potassium et ils assurent le transport d'ions  $K^+$  à travers les membranes (Nichols et Lopatin, 1997 ; Doupnik *et al.*, 1995).

#### 3.2.1.1 Les différentes sous-familles

Kir1.x est impliqué dans le transport au niveau des membranes transépithéliales, en particulier le rein. Kir2.x contrôle l'excitabilité du cœur et du cerveau. Kir3.x forme des canaux activés par des protéines G et contrôle les effets des récepteurs couplés aux protéines G sur l'activité du cœur, des nerfs et des cellules neurosécrétrices (Yamada *et al.*, 1998). Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) – composés des sous-unités Kir6.x et SUR – sont régulés par les nucléotides cytosoliques et lient le métabolisme cellulaire à l'activité électrique et au flux d'ions  $K^+$  (Ashcroft et Gribble, 1998). Ils sont importants pour la régulation de la sécrétion d'insuline, la réponse à une ischémie cérébrale ou cardiaque et le contrôle du tonus vasculaire des muscles lisses. Les rôles physiologiques des canaux Kir4.1, Kir5.x et Kir7.x n'ont pas encore été pleinement élucidés. Les identités de séquences entre les diverses sous-familles sont illustrées par l'arbre phylogénétique de la **Figure 9**.

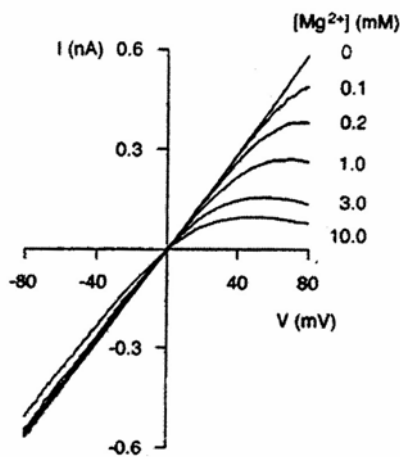


**Figure 9 :** Arbre phylogénétique représentant les sous-familles de canaux Kir. Il y a 50 à 60 % d'identité de séquence dans une même sous-famille et 30 à 40 % entre les sous-familles.

(Reimann et Ashcroft, 1999)

#### 3.2.1.2 La rectification

Les canaux Kir sont dits rectifiant entrants car ils favorisent le courant entrant par rapport au courant sortant. En d'autres termes, ils conduisent plus le courant quand le potentiel de membrane est hyperpolarisé que quand il est dépolarisé. Cette propriété résulte principalement d'un blocage voltage-dépendant des courants sortants par des cations cytoplasmiques – essentiellement le  $Mg^{2+}$  et les polyamines – qui entrent dans le pore sous l'effet du voltage et empêchent ainsi l'efflux de  $K^+$  (Nichols et Lopatin, 1997 ; Doupnik *et al.*, 1995). Ces cations interagissent avec les résidus chargés négativement du TM2 et/ou le C-ter et induisent la rectification entrante (**Figure 10**). Il a été suggéré que les polyamines se lient au site C-ter, qui devient ainsi chargé positivement et qui agirait comme un domaine inactivateur en bloquant le pore de son côté cytoplasmique de manière analogue à l'inhibition des canaux potassiques voltage-dépendants (Lee *et al.*, 1999a).



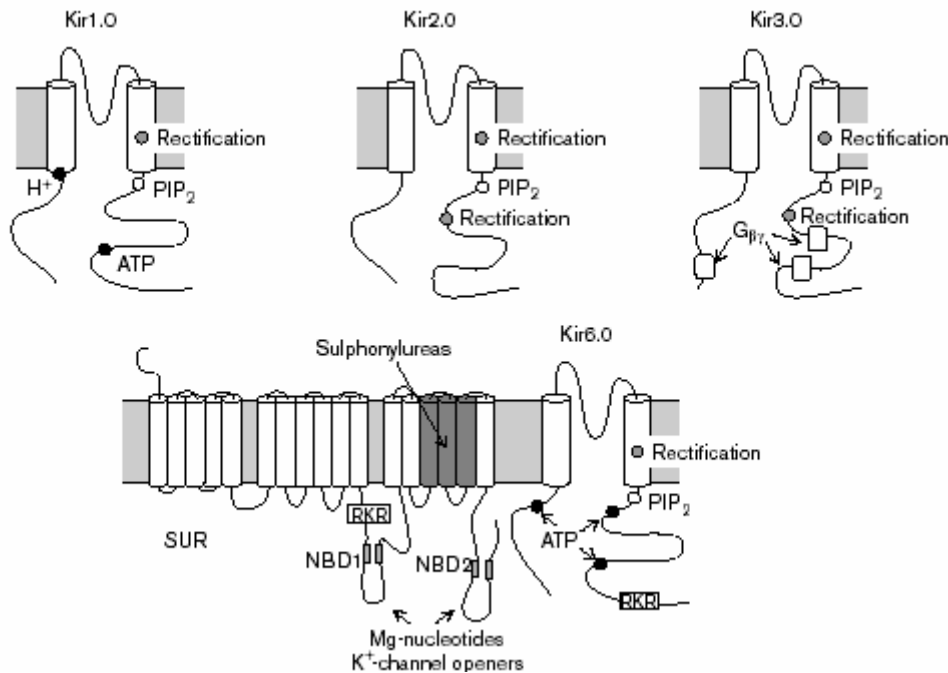
**Figure 10 :** Le magnésium intracellulaire est responsable de la rectification entrante. Les ions  $Mg^{2+}$  bloquent la sortie des ions  $K^+$  du canal Kir1.1 lorsque le potentiel est positif et ce d'autant plus que leur concentration est importante. Cet effet dépend du potentiel puisque seuls les courants sortants sont affectés.

(Ashcroft, 2000).

### 3.2.1.3 Structure des canaux Kir

Les canaux Kir sont des tétramères de quatre sous-unités identiques (homomères) ou distinctes (hétéromères) qui ont chacune deux domaines transmembranaires TM liés par une boucle contenant la signature des canaux potassiques GYG ou GFG (Nichols et Lopatin, 1997 ; Doupnik *et al.*, 1995)(**Figure 11**). Kir1.x, Kir2.x et Kir6.x sont in vivo des homotétramères. Au contraire, les canaux Kir3.x existent sous forme d'hétéromères dans le cerveau (Kir3.1 et Kir3.2) et dans le cœur (Kir3.1 et Kir3.4). Le cas des canaux Kir6.x est unique dans la mesure où ils s'associent à une sous-unité régulatrice – le récepteur des sulfonilurées (SUR) – pour former un canal octamérique (4:4) (Clement *et al.*, 1997 ; Ashcroft et Gribble, 1998).





**Figure 11** : Représentation de la topologie des canaux Kir. Chaque sous-unité est constituée de deux domaines transmembranaires reliés par une boucle formant le pore. Les extrémités N- et C-terminale sont intracellulaires, avec une extrémité N-ter plus longue et contenant des résidus impliqués dans l'interaction avec le  $\text{PIP}_2$ . Les résidus impliqués dans la rectification, la modulation par le  $\text{PIP}_2$ , l'inhibition par l'ATP ou par les protons sont indiqués ainsi que les régions impliquées dans la régulation par le  $\text{G}_{\beta\gamma}$ , les nucléotides, les ouvreurs potassiques ou les sulfonyleurées. RKR désigne le motif de rétention au réticulum endoplasmique des sous-unités SUR et Kir6.2.

(Reimann et Ashcroft, 1999)

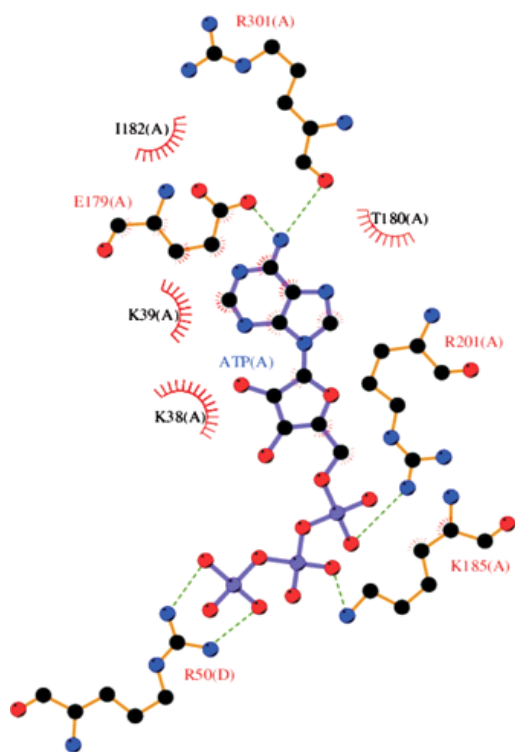
### 3.2.1.4 Régulation

Les canaux Kir sont modulés par une grande variété de ligands intracellulaires, incluant les sous-unités  $\text{G}_{\beta\gamma}$  des protéines hétérotrimériques liant le GTP, le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ), l'ATP et les protons (**Figure 11**).

Deux motifs au niveau du C-ter et un au niveau du N-ter de Kir3.1 sont impliqués dans la liaison du  $\text{G}_{\beta\gamma}$  (Yamada *et al.*, 1998). Les deux extrémités lient le  $\text{G}_{\beta\gamma}$ , même si le C-ter a dix fois plus d'affinité pour le ligand (Huang *et al.*, 1995). Les extrémités N-ter et C-ter se lient également entre elles, ce qui semble favoriser la liaison du  $\text{G}_{\beta\gamma}$ . Kir 3.2 et Kir3.4 possèdent les mêmes motifs aux extrémités N-ter et C-ter proximales, mais ne présentent pas les motifs à l'extrémité C-ter distale (Doupnik *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1995). L'activation par le GTP des canaux cardiaques Kir3.1 + Kir3.4 montre une coopérativité

positive (coefficient de Hill de 3) et corrobore l'hypothèse selon laquelle quatre  $G_{\beta\gamma}$  doivent se lier pour activer le canal.

Des études biochimiques (Tanabe *et al.*, 1999) ont montré que l'ATP se lie directement à la sous-unité Kir6.2 des canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ). Des mutations influençant l'effet inhibiteur de l'ATP ont été identifiées (Tucker *et al.*, 1998 ; Drain *et al.*, 1998). Certaines de ces mutations ont un effet indirect qui résulte de l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Trapp *et al.*, 1998 ; Shyng *et al.*, 1997a). Les mutations qui diminuent la sensibilité à l'ATP sans altérer les cinétiques du canal se situent au niveau des extrémités C-ter et N-ter, ce qui suggère que les deux domaines contribuent à l'inhibition par l'ATP. Une implication similaire des extrémités C-ter et N-ter est observée pour la modulation redox des canaux Kir1.1 qui suit l'inhibition par les protons (Fakler *et al.*, 1996) et pour la liaison du  $G_{\beta\gamma}$  à Kir3.x comme présenté plus haut. Plus récemment, Antcliff *et al.* (2005) ont construit un modèle du site de liaison de l'ATP (**Figure 12**). La liaison se fait à l'interface entre deux sous-unités (Antcliff *et al.*, 2005). Les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP interagissent avec R201 et K185 de l'extrémité N-ter de la première sous-unité alors que le phosphate  $\gamma$  interagit avec R50 de l'extrémité C-ter de l'autre sous-unité. L'adénine interagit avec les résidus E179 et R301 de la première sous-unité.



**Figure 12 :** Interaction entre l'ATP et les résidus formant la poche de liaison. L'origine (A ou D) des résidus est indiquées. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes pointillées et les interactions hydrophobes par des rayons de soleil. (Antcliff *et al.*, 2005)

Une caractéristique de la plupart des canaux est que l'activité du canal disparaît lentement après l'excision du patch, phénomène désigné par le terme de « rundown » (Becq, 1996). Le « rundown » des canaux  $K_{ATP}$  résulterait d'une perte graduelle de phospholipides membranaires ( $PIP_2$ ) suite à l'excision du patch. En effet, l'application de  $PIP_2$  ou de Mg-ATP (qui augmente la formation de  $PIP_2$  endogène) abolit le « rundown » (Hilgermann et Ball, 1996). Le  $PIP_2$  interagit également avec d'autres types de canaux Kir (Kir1.1, Kir2.1, Kir3.1/Kir3.4, Kir6.2) (Huang *et al.*, 1998). La mutation de l'arginine 176 dans le C-ter de Kir6.2 accélère le « rundown » et réduit la capacité du  $PIP_2$  à inverser cette tendance, ce qui suggère que cette arginine fait partie du site de liaison des lipides (Fan et Makielski, 1997). Une mutation équivalente dans Kir1.1 réduit l'affinité pour le  $PIP_2$  (Huang *et al.*, 1998). A l'heure actuelle, on ne sait toujours pas comment le  $PIP_2$  active les canaux Kir ; cependant, étant donné que les cations polyvalents sont capables de s'opposer à l'activation du  $PIP_2$ , probablement en masquant des surfaces chargées négativement, des interactions électrostatiques doivent être impliqués (Fan et Makielski, 1997).

De plus le  $PIP_2$  interagit avec d'autres agents qui modulent l'activité des canaux Kir. Ainsi, l'activation des canaux hétéromériques Kir3.1/Kir3.4 par le  $G_{\beta\gamma}$ , ou par le  $Na^+$ , dépend du  $PIP_2$  (Sui *et al.*, 1998). Réciproquement, l'interaction entre le  $PIP_2$  et Kir3.x est stabilisée par le  $G_{\beta\gamma}$  (Huang *et al.*, 1998). Le phospholipide diminue la sensibilité des canaux  $K_{ATP}$  pour l'ATP ( $K_i$  de l'ordre du millimolaire) (Shyng et Nichols, 1998 ; Baukrowitz *et al.*, 1998). Ceci pourrait expliquer pourquoi la sensibilité à l'ATP du canal est plus faible chez les cellules intactes qu'en patch excisé, puisque le  $PIP_2$  disparaît après l'excision. Le mécanisme par lequel le  $PIP_2$  modifie la sensibilité à l'ATP n'est pas encore connu mais trois hypothèses ont été émises (Fan et Makielski, 1997 ; Shyng et Nichols, 1998 ; Baukrowitz *et al.*, 1998). La première, le  $PIP_2$  agirait de manière indirecte en agissant sur la probabilité d'ouverture du canal ; la deuxième, le  $PIP_2$  et l'ATP seraient en compétition pour le même site de liaison (ou un chevauchement des sites) sur Kir6.2 ; la troisième, la diminution de la concentration en ATP locale résulterait des effets électrostatiques des charges négatives du  $PIP_2$ .

### **3.2.1.5 Pathologies**

Des mutations dans les gènes codant les canaux Kir sont responsables de maladies héréditaires chez l'homme et chez la souris : le syndrome de Bartter type III (*Kir1.1*), l'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante du nourrisson (PHHI, *Kir6.2*), le diabète (*Kir6.2*) et la souris *weaver* (*Kir3.2*).

Le syndrome de Bartter est un désordre du tubule rénal caractérisé par des rejets salés, une hypocalcémie et une acidose métabolique. Les mutations de *Kir1.1* qui ont été analysées fonctionnellement révèlent soit une abolition soit une diminution marquée des courants Kir1.1 (Derst *et al.*, 1997).

Les pathologies résultant de mutations du gène *Kir6.2* sont présentées par la suite (chapitre Rôles physiologiques et pathologies).

La souris *weaver* résulte d'une mutation dans le pore de Kir3.2, ce qui rend le canal perméable aux ions Na<sup>+</sup>. La mutation conduit à une mort sélective des neurones du cerveau et ainsi à une démarche ataxique caractéristique du phénotype *weaver*. Des animaux homozygotes knock-out qui n'expriment pas *Kir3.2* ne présentent pas d'ataxie et leur cerveau a une morphologie normale (Signorini *et al.*, 1997). Ainsi, il semble que l'augmentation de l'influx de Na<sup>+</sup>, plutôt que la perte de Kir3.2, soit responsable de la mort neuronale chez les souris *weaver*.

Protéine	Localisation tissulaire	Régulation	Pathologie	Remarques	Références
<b>Kir1.1 (ROMK)</b>	Rein	Protons et ATP	syndrome de Bartter type III		Yano <i>et al.</i> , 1994
<b>Kir2.x (IRK)</b>	Cœur et système nerveux	Phosphorylation		3 membres	Raab-Graham <i>et al.</i> , 1994
<b>Kir3.1 (GIRK1)</b>	Cœur, cerveau	Protéines G			Stoffel <i>et al.</i> , 1994
<b>Kir3.2 (GIRK2)</b>	Cerveau		souris <i>weaver</i>		Sakura <i>et al.</i> , 1995b
<b>Kir3.3 (GIRK3)</b>	Cerveau				Lesage <i>et al.</i> , 1995
<b>Kir3.4 (GIRK4)</b>	Cœur				Tucker <i>et al.</i> , 1995
<b>Kir4.1</b> <b>Kir5.1</b>	Cerveau			Association en proportion 2:2	

<b>Kir6.1 (uKATP1)</b>	Ubiquitaire				Inagaki <i>et al.</i> , 1995b
<b>Kir6.2</b>	Pancréas, cœur, cerveau, muscles		PHHI diabète		Inagaki <i>et al.</i> , 1995c
<b>Kir7.1</b>	Cellules épithéliales, cerveau, poumons, reins			Couplage avec la pompe Na/K	Doring <i>et al.</i> , 1999 Karschin, 2000 Nakamura <i>et al.</i> , 1999 Partiseti <i>et al.</i> , 1998

**Tableau 2 :** Inventaire des différents canaux potassiques à rectification entrante.

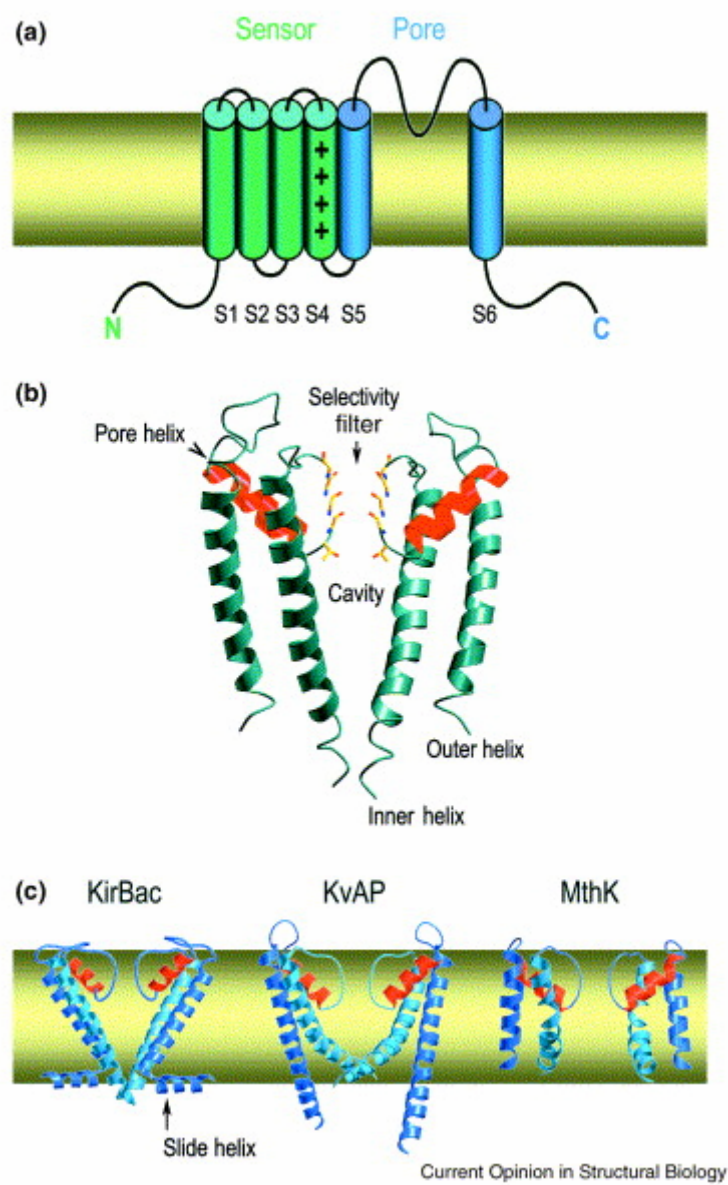
### 3.2.2 Structure cristalline de canaux potassiques

L'analyse cristallographique de KcsA (Doyle *et al.*, 1998) – canal potassique de la bactérie *Streptomyces lividans* - a révélé que le canal est un tétramère de quatre sous-unités identiques arrangées de manière symétrique autour du pore central. Chaque sous-unité contient deux hélices  $\alpha$  transmembranaires (TM1 et TM2), liées par une extension de 30 acides aminés qui forme le pore et la boucle extracellulaire. Les quatre hélices TM2 forment un tipi inversé. Comme le suggèrent les analyses mutationnelles, le pore forme un filtre étroit de sélectivité (longueur  $\sim 8$  Å), proche de la membrane extracellulaire. La sélectivité résulte de l'interaction de l'ion  $K^+$  déshydraté avec le squelette des groupes carbonyles des deux résidus glycine du motif GYG. La chaîne latérale de la tyrosine pointe à l'extérieur de la lumière du pore et son interaction avec les résidus adjacents permet de fixer le diamètre du pore pour une chélation optimale des ions  $K^+$ . Sous ce filtre de sélectivité s'étend une large cavité (10 Å de diamètre) composée de résidus hydrophobiques.

Bien qu'il n'ait seulement que deux domaines transmembranaires (TM) la séquence en acides aminés de KcsA est plus homologue à celle des canaux potassiques voltage-dépendant ( $K_V$ ) qu'à celle des canaux Kir. Ainsi, il semble que la structure des canaux Kir diffère de celle de KcsA. Tout d'abord, il est possible d'incorporer dans le pore de Kir2.1 plusieurs réactifs sulfhydryl simultanément, ce qui suggère que le pore de Kir2.1 est plus

large, avec un diamètre supérieur à 12 Å (Lu *et al.*, 1999). Ensuite, la mutation de la tyrosine du motif GYG en une série d'autres résidus (incluant la proline) n'abolit pas la sélectivité des canaux Kir pour le potassium (Silvermann *et al.*, 1998). Une mutation similaire dans le canal K<sub>V</sub> *Shaker* résulte en un canal non fonctionnel (Heginbotham *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent qu'il y a des différences entre les filtres de sélectivité des canaux Kir et K<sub>V</sub>. Enfin des études de mutagenèse suggèrent que les TM de Kir2.1 ont une organisation différente de celle de KcsA (Minor *et al.*, 1999).

Depuis la première structure en trois dimensions du canal potassique KcsA (Doyle *et al.*, 1998) de nouvelles structures représentatives des trois grandes familles de canaux potassiques sont sorties : MthK, canal calcium-dépendant (Jiang *et al.*, 2002) ; KvAP, canal voltage-dépendant (Jiang *et al.*, 2003) et KirBac1.1, canal rectifiant entrant (Kuo *et al.*, 2003). Même si l'architecture du pore est semblable, les structures présentent une variabilité de conformation considérable (**Figure 13**)



**Figure 13 : Architecture de canaux  $K^+$ .**

(a) La plupart des sous-unités des canaux  $K^+$  possèdent six segments transmembranaires. Elles en présentent toutes au moins deux qui correspondent aux segments S5-S6. Le pore est au centre d'un tétramère de ses sous-unités.

(b) Deux sous-unités diamétralement opposées de KcsA permettent de distinguer la cavité dans la membrane.

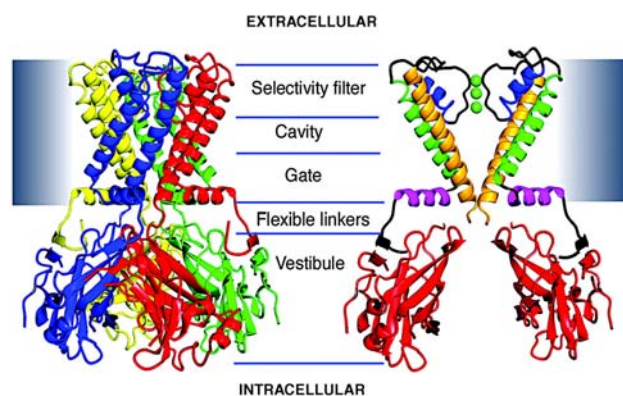
(c) Plasticité conformationnelle du pore. Deux sous-unités des trois types de canaux  $K^+$  sont représentées.

(Gulbis et Doyle, 2004)

Etant donné que nous nous intéressons plus particulièrement aux canaux potassiques rectifiant entrants, nous ne parlerons ici que de la structure de KirBac1.1.

La structure de KirBac1.1 consiste en une section membranaire en hélices  $\alpha$  et en un domaine intracellulaire essentiellement en feuillets  $\beta$ . Sa structure peut être divisée en cinq régions : le filtre de sélectivité, la cavité, l'entrée, les liaisons flexibles et le vestibule cytoplasmique (**Figure 14**).

**Figure 14 : Structure générale de KirBac1.1.** La membrane est représentée par le liseré gris. Sur la gauche, les monomères sont colorés individuellement pour souligner leur orientation relative. Sur la droite, seuls deux monomères sont représentés pour plus de clarté, on distingue ainsi : l'hélice horizontale (violette), l'hélice extérieure (verte), l'hélice du pore (bleue), l'hélice interne (jaune) et le domaine C-terminal (rouge).



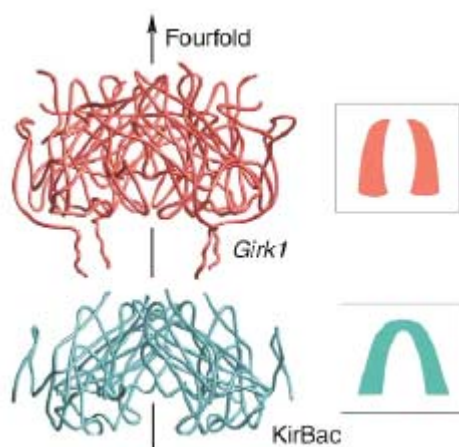
(Kuo *et al.*, 2003)

Cette structure plus récente permet l'identification de contacts intramoléculeux qui sont responsables de la complète occlusion du pore sur la face intracellulaire de la



membrane. Ces contacts sont supposés être « la porte d'activation » de tous les canaux  $K^+$ . Le canal KirBac adopte une forme de sablier, résultant d'une constriction du pore sur la face intracellulaire. Cette constriction est la conséquence d'un réseau de liaisons hydrogènes impliquant les domaines intracellulaires et les lipides. Trois ions occupent le filtre de sélectivité dans la structure de KirBac. Ceci peut résulter de deux configurations : une configuration avec un ion au site central et une configuration avec deux ions séparés de 7 Å (comme dans les autres structures des canaux  $K^+$ ). Le flux d'ions qui caractérise les canaux  $K^+$  a été décrit par un mécanisme basé sur une répulsion électrostatique, telle que lorsqu'un nouvel ion entre dans le filtre de sélectivité, le  $K^+$  distal est chassé comme une boule de billard.

Si l'on compare les structures intracellulaires de Kir3.1 (Girk1) (Nishida et MacKinnon, 2002) et de KirBac1.1, les deux tétramères sont quelque peu différents (**Figure 15**).



**Figure 15 :** Structures en tube des tétramères intracellulaires de Girk1 (orange) et de KirBac (turquoise). Même s'il y a superposition d'une seule sous-unité, le tétramère semble différent. KirBac est pincé au sommet et élargi à la base comparativement à Girk1. Ceci entraîne également des modifications au sein de la cavité interne et pourrait correspondre aux configurations adoptées lors des différents états d'ouverture ou de fermeture du canal. (Gulbis et Doyle, 2004).

## 4 Identifications cellulaires

Les travaux sur les  $K_{ATP}$  sont nés lorsque la technique du patch-clamp a pu s'appliquer aux cardiomyocytes (Noma, 1983 ; Trube et Hescheler, 1983, 1984) et aux cellules  $\beta$  pancréatiques (Cook et Hales, 1984). Des courants de canaux potassiques rectifiant entrants de même conductance ont pu être enregistrés et l'application d'ATP sur la face cytoplasmique du patch inhibait ces courants.

Un an plus tard, il fut démontré que les courants des cellules  $\beta$  pancréatiques étaient inhibés par des sulfonylurées (drogues hypoglycémiantes) et qu'ils jouaient ainsi un rôle dans le contrôle de la sécrétion d'insuline (Struggess *et al.*, 1985). Peu de temps après, plusieurs groupes montrèrent que le diazoxide (ouvreuse potassique) activait les canaux  $K_{ATP}$  des cellules  $\beta$  pancréatiques (Trube *et al.*, 1986) et des muscles lisses vasculaires (Quast et Cook, 1989). Le cromakalin, autre ouvreuse potassique, activait les canaux  $K_{ATP}$  des myocytes cardiaques (Escande *et al.*, 1988 ; Sanguinetti *et al.*, 1988). Les mêmes observations ont été faites avec le pinacidil (Arena et Kass, 1989) et le nicorandil (Shen *et al.*, 1991). Les comparaisons fonctionnelles et pharmacologiques de ces canaux  $K_{ATP}$  dans différents tissus permirent de mettre en évidence l'existence d'isoformes, différant principalement dans leur réponse aux nucléotides et aux agents pharmacologiques.

Le rôle clef des canaux  $K_{ATP}$  dans le couplage de l'excitabilité membranaire au métabolisme, et ainsi leur importance médicale et thérapeutique, est à l'origine d'un effort important pour tenter de les cloner.

#### **4.1 Historique des clonages**

Les premiers clonages de canaux potassiques rectifiant entrants Kir1.1 (Ho *et al.*, 1993), Kir2.1 (Kubo *et al.*, 1993a) et Kir3.1 (Kubo *et al.*, 1993b) ont permis de cloner par homologie les canaux Kir6.1 (Inagaki *et al.*, 1995b) et Kir6.2 (Inagaki *et al.*, 1995c).

En se basant sur la propriété du glibenclamide à se lier avec une haute affinité au récepteur des sulfonylurées, ce dernier a pu être cloné à l'aide de glibenclamide- $^{125}\text{I}$  dans les cellules  $\beta$  de rat et de hamster (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995). Les isoformes du sarcolemme (Inagaki *et al.*, 1996) et du muscle lisse (Isomoto *et al.*, 1996 ; Yamada *et al.*, 1997) ont alors pu être obtenues.

Il est apparu que seule la co-expression de SUR et de Kir6.2, au niveau de la membrane plasmique, reconstituait un canal  $K_{ATP}$  fonctionnel (Inagaki *et al.*, 1995a).

#### **4.2 Assemblage tissulaire**

Il existe deux isoformes de Kir6.x : Kir6.1 et Kir6.2 et trois de SUR : SUR1, SUR2A et SUR2B. Les variations dans la composition des sous-unités constituant les canaux  $K_{ATP}$  résultent en une sensibilité métabolique et pharmacologique différente suivant le tissu considéré. Dans la plupart des tissus, Kir6.2 forme le pore mais il s'associe avec différentes sous-unités SUR : par exemple SUR1 dans le pancréas et le cerveau, SUR2A

dans le cœur et le muscle squelettique et SUR2B dans le cerveau et le muscle lisse. Dans certains muscles lisses on trouve l'association Kir6.1/SUR2B. L'assemblage des sous-unités en fonction du type cellulaire considéré est récapitulé dans le **Tableau 3**.

Type cellulaire	SUR	Kir6.x	Conductance	Références
Neurones	SUR1	Kir6.1	65 pS	Lee <i>et al.</i> , 1999
Cellules $\beta$ pancréatiques	SUR1	Kir6.2	70 pS	Cook et Hales, 1984
ND	SUR2A	Kir6.1	35 pS	Kondo <i>et al.</i> , 1998
Cœur  Muscles squelettiques	SUR2A	Kir6.2	80 pS	Inagaki <i>et al.</i> , 1996
Muscles lisses vasculaires	SUR2B	Kir6.1	30 pS	Beech 1993
Muscles lisses	SUR2B	Kir6.2	80 pS	Isomoto <i>et al.</i> , 1996

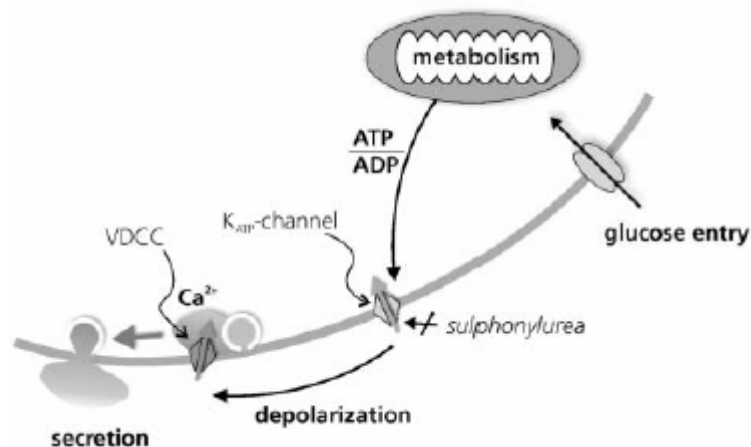
**Tableau 3 :** Assemblage des sous-unités formant les canaux  $K_{ATP}$  et conductances unitaires.  
(ND : non déterminé).

## 5 Rôles physiologiques et pathologies

Les canaux  $K_{ATP}$  forment un lien entre l'état métabolique de la cellule et la perméabilité de la membrane aux ions  $K^+$  qui, à leur tour, sont un déterminant majeur du potentiel membranaire. Les canaux  $K_{ATP}$  sont présents dans différents types cellulaires. Leur régulation par l'ATP et autres nucléotides et leur modulation par des facteurs cellulaires tels que le pH ou l'activité kinase varient quelque peu et s'accordent avec la fonction que ces canaux doivent remplir. Dans la plupart des tissus excitables ils sont fermés et ne s'ouvrent que lorsque le métabolisme est affaibli ; de ce fait, la cellule est transposée dans un état de repos qui permet de limiter la consommation d'ATP et l'aide à préserver son intégrité structurale. Cependant il y a quelques exceptions comme, par exemple, dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, dans certains neurones, où ces canaux sont ouverts durant le fonctionnement normal de la cellule.

## 5.1 Les canaux $K_{ATP}$ du pancréas

Le rôle du canal  $K_{ATP}$  est assez bien compris dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, où les modifications de l'activité du canal, induites par le métabolisme, jouent un rôle essentiel dans la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (**Figure 16**).



**Figure 16 :** Modèle de cellule  $\beta$  pancréatique résumant les rôles des principaux acteurs. L'ATP produit par la glycolyse et le cycle de Krebs entraîne l'inhibition et donc la fermeture du canal  $K_{ATP}$ . Une dépolarisation membranaire résulte de la réduction de l'efflux de potassium ce qui permet l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (VDCC). L'augmentation du taux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  conduit à la fusion des vésicules de sécrétion d'insuline avec la membrane plasmique et à la libération d'insuline dans le sang (Barg, 2003). Les sulfonylurées, utilisées dans le traitement du diabète de type II, inhibent directement les canaux  $K_{ATP}$ , indépendamment de l'état métabolique de la cellule, et permettent ainsi la sécrétion d'insuline.

A de faibles concentrations de glucose, les canaux  $K_{ATP}$  sont ouverts et leur activité maintient le potentiel membranaire de repos à un niveau hyperpolarisé. L'augmentation de la concentration de glucose dans le sang induit l'entrée de glucose dans la cellule ce qui active son métabolisme et modifie les concentrations de nucléotides cytosoliques. Les canaux  $K_{ATP}$  se ferment ce qui conduit à une dépolarisation de la membrane des cellules  $\beta$  pancréatiques, et ainsi à l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule via l'activation de canaux calciques voltage-dépendants. L'insuline est alors libérée dans la circulation. L'importance physiologique des canaux  $K_{ATP}$  (SUR1/Kir6.2) dans la régulation de la sécrétion d'insuline est démontrée par le fait que des mutations de la sous-unité SUR1 ont été trouvées chez des patients présentant une hypoglycémie hyperinsulinémique persistante de l'enfant (PHHI),

un désordre sérieux caractérisé par une sécrétion d'insuline excessive et non régulée. De plus, des cas de diabète, à la fois chez l'homme et chez la souris transgénique résultent d'une dérégulation métabolique des canaux  $K_{ATP}$ .

Des canaux  $K_{ATP}$  ont également été décrits dans les cellules  $\alpha$  sécrétrices de glucagon (Gopel *et al.*, 2000b) et les cellules  $\delta$  sécrétrices de somatostatine (Gopel *et al.*, 2000a) du pancréas. Dans les deux types cellulaires, le métabolisme du glucose induit une fermeture des canaux  $K_{ATP}$ . Dans les cellules  $\delta$ , cela cause une sécrétion hormonale (comme dans les cellules  $\beta$ ). Dans les cellules  $\alpha$ , cependant, la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  induit une dépolarisation membranaire qui conduit à une inactivation des canaux voltage-dépendants qui participent à la création de potentiel d'action. Ainsi la sécrétion de glucagon est inhibée.

Les souris transgéniques sont des outils intéressants pour analyser le rôle physiologique des canaux  $K_{ATP}$  (Seino *et al.*, 2000). La mutation de la glycine 132 en sérine, au niveau du filtre de sélectivité de la région S5, dans la séquence de Kir6.2 a un effet dominant négatif sur les canaux  $K_{ATP}$  (Miki *et al.*, 1997). En exprimant ce transgène sous le contrôle du promoteur de l'insuline, il a été montré l'absence de fonctionnalité de ces canaux dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Les souris transgéniques néonatales développent une hypoglycémie avec une hyperinsulinémie, qui progresse en une hyperglycémie avec une hypoinsulinémie ensuite. Avant l'apparition de l'hyperglycémie on trouve beaucoup de cellules  $\beta$  apoptotiques, ce qui suggère que les canaux  $K_{ATP}$  puissent jouer un rôle dans la survie des cellules  $\beta$  pancréatiques (Miki *et al.*, 2001).

Des souris knock-out pour le gène *Kir6.2* présentent un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux sulfonylurées, soulignant l'importance des canaux  $K_{ATP}$  dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, mais leur glycémie est globalement moins modifiée que celle des souris précédemment citées (Miki *et al.*, 1998).

Des souris knock-out pour le gène *SURI* présentent une glycémie normale (Seghers *et al.*, 2000). Cependant elles sont hypersensibles à l'insuline : elles deviennent hyperglycémiques quand on charge en glucose et plus hypoglycémiques en cas de jeûne que les souris sauvages. Des îlots de Langerhans isolés de souris knock-out pour le gène *SURI* ne présentent pas de sécrétion d'insuline basale et ont une sécrétion d'insuline faible en réponse à la stimulation par le glucose. Comme attendu, on ne peut enregistrer de courants  $K_{ATP}$  chez ces souris knock-out pour le gène *Kir6.2* ou pour le gène *SURI* (Miki

*et al.*, 2001a ; Seghers *et al.*, 2000). Etant donné que des patients porteurs de mutations dans le gène *SUR1* présentent des hypoglycémies sévères, contrairement aux souris knock-out pour le gène *SUR1*, on pense que les mécanismes de contrôle de la sécrétion d'insuline sont différents chez l'homme et chez la souris (Seghers *et al.*, 2000).

### 5.1.1 L'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante infantile (PHHI)

Le PHHI, également connu sous le nom d'hyperinsulinisme familial ou de nésidoblastose, est un désordre héréditaire caractérisé par des taux anormaux d'insuline malgré une sévère hypoglycémie (Sharma *et al.*, 2000). Il se manifeste dès la naissance ou dans les années qui suivent et, en absence de traitement médical, peut être létal ou causer des dommages neurologiques irréversibles. Certains cas peuvent être traités avec du diazoxide (ouvreur potassique) ou en supplémentant le régime avec du glucose, mais les cas les plus sévères requièrent une pancréatectomie. La fréquence du PHHI dans la population totale est faible mais dans les populations consanguines il peut toucher 1 naissance sur 2500. Dans la plupart des familles, le PHHI est héréditaire de manière autosomale récessive, mais des formes dominantes ont également été décrites (Glaser *et al.*, 1998 ; Huopio *et al.*, 2000). Des cas sporadiques ont également été identifiés.

Cette maladie résulte de mutations dans au moins quatre gènes différents : Kir6.2, SUR1 et les enzymes glucokinase (Glaser *et al.*, 1998) et glutamate déshydrogénase (Stanley *et al.*, 1998). Les mutations du gène *SUR1* sont les plus fréquentes, environ 50 % des cas. On pense que toutes ces mutations conduisent à une perte de la fonctionnalité des canaux  $K_{ATP}$  dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, provenant d'un défaut du canal lui-même ou de sa régulation métabolique.

Trois mutations responsables du PHHI ont été identifiées dans le gène *Kir6.2* (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999 ; Nestorowicz *et al.*, 1997 ; Thomas *et al.*, 1996b) et un certain nombre dans le gène *SUR1* (Dunne *et al.*, 1997 ; Kane *et al.*, 1996 ; Nestorowicz *et al.*, 1996 ; Nichols *et al.*, 1996 ; Otonkoski *et al.*, 1999 ; Sharma *et al.*, 2000 ; Shyng *et al.*, 1998 ; Tanizawa *et al.*, 2000 ; Thomas *et al.*, 1995, 1996a ; Verkarre *et al.*, 1998). Les mutations de *Kir6.2* comprennent deux mutations faux-sens, L147P et W91R, et une mutation non-sens qui coupe Kir6.2 après 12 acides aminés. De telles protéines porteuses de ces mutations ne constituent pas des canaux  $K_{ATP}$  fonctionnels lorsqu'on les co-exprime avec SUR1. Les mutations de SUR1 sont très hétérogènes. On les trouve tout au long du gène et elles incluent des non-sens, des faux-sens, un décalage du cadre de lecture, des

mutations qui affectent l'épissage. Ces mutations peuvent être regroupées en deux larges classes : celles qui affectent l'adressage du canal à la membrane plasmique, et celles qui causent la fermeture permanente du canal, quel que soit l'état métabolique de la cellule.

L'analyse de ces mutations, soit par l'examen de cellules  $\beta$  issues de pancréatectomie (Kane *et al.*, 1996), soit par l'expression hétérologue de canaux mutés (Cartier *et al.*, 2001 ; Nichols *et al.*, 1996 ; Otonkoski *et al.*, 1999 ; Shyng *et al.*, 1997), ont permis d'éclaircir le rôle physiologique de ces canaux, ainsi que les relations structure/fonction. L'une de ces mutations ( $\Delta$ F1388 dans *SUR1*) est responsable d'un mauvais adressage à la membrane plasmique (Cartier *et al.*, 2001). Ces canaux  $\Delta$ F1388 ont une sensibilité à l'ATP réduite et ne répondent pas à la stimulation du Mg-ADP ou du diazoxide, lorsqu'on parvient à les adresser à la membrane plasmique à l'aide de mutations.

D'autres mutations influencent l'interaction des nucléotides avec la sous-unité SUR1. La mutation G1479R, au niveau du NBD2, réduit fortement l'activation du canal par le Mg-ADP (Nichols *et al.*, 1996). D'autres mutations ayant le même effet ont été identifiées (Huopio *et al.*, 2000 ; Shyng *et al.*, 1997). Ces canaux mutés sont incapables de répondre aux modifications du métabolisme. Dans certains cas, les canaux mutés sont encore sensibles au diazoxide ce qui explique que les patients atteints de PHHI répondent à cette drogue. Une mutation faux-sens, (R1420C) au niveau du NBD2 de SUR1, réduit l'affinité de la liaison des nucléotides au NBD2 et l'effet du Mg-ADP n'est possible qu'à de plus fortes concentrations (Matsuo *et al.*, 2000b). Elle réduit également l'expression de surface des canaux.

Les mutations pour lesquelles SUR1 n'atteint pas la membrane plasmique sont responsables de formes sévères de PHHI. Les mutations associées à une perte ou à une réduction de l'activation par le Mg-ADP apparaissent moins sévères. Cependant, des mutations qui n'altèrent que faiblement la fonctionnalité du canal *in vitro*, peuvent être associées à des maladies graves. Ainsi, les relations précises entre une mutation individuelle et la sévérité du phénotype clinique, ne sont pas complètement élucidées.

### **5.1.2 Le diabète**

Etant donné que les canaux  $K_{ATP}$  régulent la sécrétion d'insuline, il semble logique de penser que des mutations des gènes *SUR1* ou *Kir6.2* puissent conduire au diabète.

Les résultats de l'analyse des mutations de *SUR1* ou de *Kir6.2* demeurent confus. Plusieurs groupes ont rapporté que les variations génétiques de *SUR1* (Iwasaki *et al.*,

1996 ; Lindner *et al.*, 1997 ; Stirling *et al.*, 1995) ou de *Kir6.2* (Sakura *et al.*, 1996) ne jouaient pas un rôle prépondérant dans la susceptibilité au diabète de type II de diverses populations (américano-mexicaine, japonaise, caucasienne ou les blancs non-hispaniques). D'un autre côté, les variations génétiques de *SUR1* (Hart *et al.*, 2000 ; Inoue *et al.*, 1996 ; Rissanen *et al.*, 2000) ou de *Kir6.2* (Hani *et al.*, 1998) ont été associées au diabète de type II dans différentes populations, incluant les caucasiens et les finlandais. Le polymorphisme E23K, au niveau du N-ter de *Kir6.2*, est associé au diabète de type II chez les caucasiens (Hani *et al.*, 1998). Cette mutation induit une petite réduction de la sensibilité à l'ATP. Cependant, d'après des études sur des souris transgéniques, il semble que de petites modifications de la sensibilité à l'ATP des canaux  $K_{ATP}$  soient suffisantes pour causer le diabète (Koster *et al.*, 2000). Par ailleurs, des modulateurs lipidiques tels que le  $PIP_2$  (Baukrowitz *et al.*, 1998 ; Fan et Makielski, 1997 ; Shyng et Nichols, 1998) et les longues chaînes d'acyl-CoA (Bränström *et al.*, 1997,1998 ; Gribble *et al.*, 1998a) réduisent également la sensibilité à l'ATP des canaux  $K_{ATP}$ . Dans les cas d'obésité, les longues chaînes d'esters d'acyl-CoA sont très présentes (Prentki et Corkey, 1996 ; Prentki *et al.*, 1997), et pourraient expliquer le lien entre l'obésité et le développement de problème de sécrétion d'insuline et de diabète de type II.

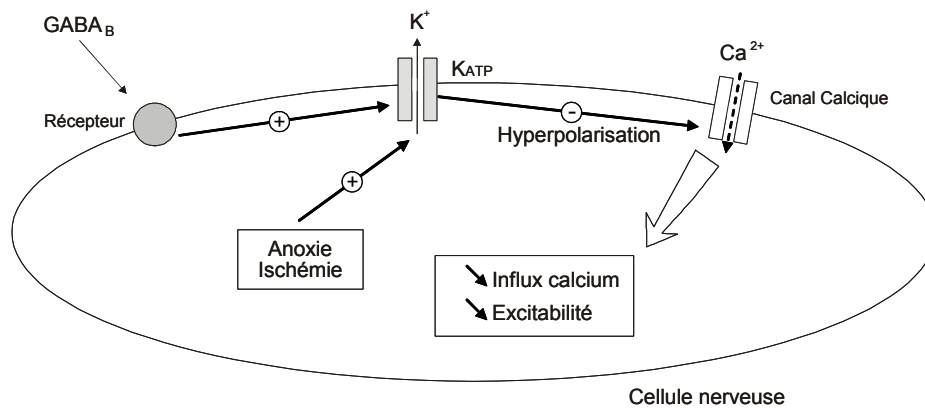
## 5.2 Les canaux $K_{ATP}$ du système nerveux central

Des études d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie suggèrent que *SUR1* et *Kir6.2* s'expriment dans différentes régions du cerveau (Karschin *et al.*, 1997). Des données de PCR (Polymerase Chain Reaction) permettent d'affiner ces régions. Elles montrent par exemple que les neurones GABAergiques dans la substance grise expriment sélectivement *SUR1* et *Kir6.2* alors que les neurones dopaminergiques de la substance grise expriment *SUR1* et *SUR2B* conjointement avec *Kir6.2* (Liss *et al.*, 1999).

Les souris transgéniques ont facilité là aussi notre compréhension du rôle des canaux  $K_{ATP}$  dans le cerveau. L'hypoxie inhibe l'activité des neurones de la substance grise chez les souris sauvages mais augmente l'activité neuronale des souris knock-out pour le gène *Kir6.2* (Yamada *et al.*, 2001). De plus, ces souris sont sujettes aux apoplexies généralisées après une brève hypoxie. Ceci suggère que l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  des neurones de la substance grise protège contre la propagation de l'apoplexie au cours d'un stress métabolique (**Figure 17**). Des souris transgéniques qui surexpriment *SUR1* dans le cortex, l'hippocampe et le striatum sont plus résistantes aux apoplexies induites par l'acide kaïnique que les souris sauvages (Hernandez-Sanchez *et al.*, 2001). Les souris



transgéniques ne perdent pas leurs neurones de l'hippocampe pyramidal après administration d'acide kaïnique, alors que les souris sauvages en perdent 70 à 80 %. Ces résultats indiquent que la surexpression de SUR1 dans le cerveau antérieur protège les souris de l'apoplexie et de la destruction neuronale. Il est difficile de savoir si les sujets atteints de PHHI porteurs de mutations dans *SUR1* et qui souffrent également de dommages neurologiques en souffrent à cause d'une perte de la fonctionnalité du canal ou à cause de taux trop faibles en glucose pour alimenter correctement le cerveau.



**Figure 17 :** Rôle des canaux  $K_{ATP}$  dans la cellule nerveuse.

*L'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  des neurones protège contre la propagation de l'apoplexie au cours d'un stress métabolique (anoxie ou ischémie).*

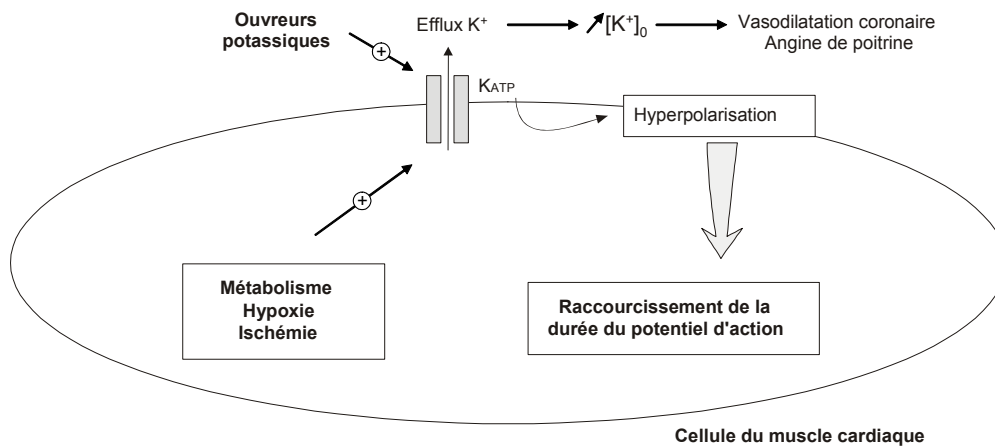
Les canaux  $K_{ATP}$  servent de capteurs de glucose chez les neurones de l'hypothalamus ventromédial, un rôle essentiel pour le maintien de l'homéostasie du glucose (Miki *et al.*, 2001). Même si la fonction des cellules  $\beta$  est normale chez les souris knock-out pour le gène *Kir6.2*, ces animaux présentent un défaut sévère de la sécrétion de glucagon en réponse à l'hypoglycémie systémique. Ainsi les canaux  $K_{ATP}$  de l'hypothalamus et des cellules  $\beta$  agissent de concert, comme capteur central et périphérique de glucose, pour réguler l'homéostasie du glucose.

## 5.3 Les canaux $K_{ATP}$ du système cardiovasculaire

### 5.3.1 Le myocarde

Dans la plupart des tissus autres que le pancréas, les canaux  $K_{ATP}$  sont fermés en conditions normales. Dans le cœur, ces canaux s'ouvrent quand la concentration intracellulaire d'ATP chute au cours d'un stress ischémique (Nichols et Lederer, 1990). Cette propriété permet de raccourcir la durée du potentiel d'action, de réduire l'influx de  $Ca^{2+}$ , et de diminuer ainsi la force de contraction et la consommation d'ATP (**Figure 18**). L'activation des canaux  $K_{ATP}$  aide donc à protéger le myocarde de l'ischémie. L'étude de

souris knock-out pour le gène *Kir6.2* confirme que les canaux du sarcolemme contenant la sous-unité Kir6.2 contrôlent l'excitabilité et la contraction produites par une inhibition métabolique ou l'administration d'ouvres potassiques (Suzuki *et al.*, 2001 ; Gumina *et al.*, 2003).



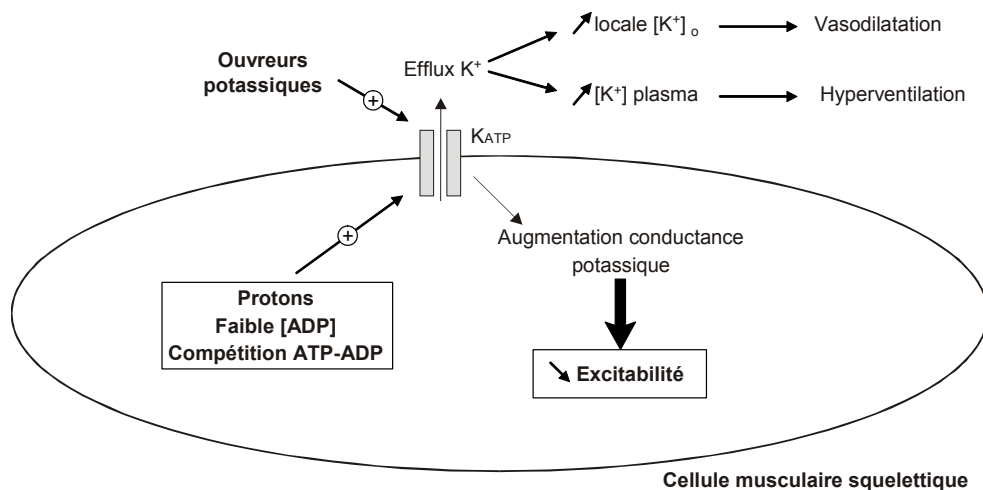
**Figure 18 :** Rôle des canaux  $K_{ATP}$  dans la cellule musculaire cardiaque.

L'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  lors d'un stress (ischémie ou hypoxie) ou d'une consommation d'ATP permet de raccourcir la durée du potentiel d'action. L'administration d'ouvres potassiques permet donc le contrôle de l'excitabilité et de la contraction.

L'analyse des génomes d'individus avec des défaillances cardiaques a permis d'identifier deux types de mutations présentes chez SUR2A. Ces mutations (non sens ou décalage du cadre de lecture) se situent au niveau de domaines conservés du NBD2 et conduisent à un dysfonctionnement du canal  $K_{ATP}$  (Bienengraeber *et al.*, 2004).

### 5.3.2 Le muscle squelettique

La densité de canaux  $K_{ATP}$  au niveau de la membrane des muscles squelettiques (ou muscles striés) conduit à penser qu'ils jouent un rôle important au cours de l'exercice musculaire (Spruce *et al.*, 1985). L'ouverture des canaux  $K_{ATP}$ , suite à une diminution locale des concentrations d'ATP et à une diminution du pH, résultant de la production de lactates, permet de réduire l'excitabilité des fibres musculaires et les protège d'un appauvrissement énergétique excessif en créant une dépolarisation membranaire qui s'oppose au potentiel d'action excitateur (**Figure 19**).



**Figure 19** : Rôle des canaux  $K_{ATP}$  dans la cellule musculaire squelettique.

L'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  crée une dépolarisation qui s'oppose au potentiel d'action.

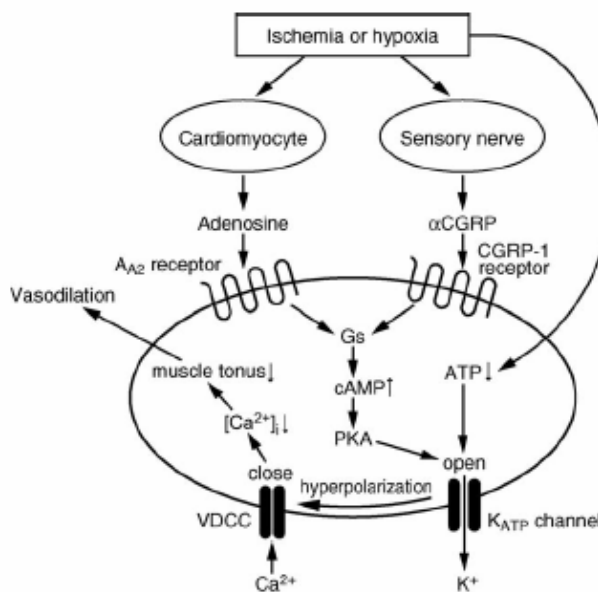
### 5.3.3 Le muscle lisse

On pense que les canaux  $K_{ATP}$  du muscle vasculaire lisse jouent un rôle dans la régulation du tonus vasculaire et donc dans la régulation du flux sanguin. Ils ont été décrits dans les muscles de l'artère mésentérique où ils sont activés par les ouvreurs potassiques, et inhibés par le glibenclamide (Ashcroft et Ashcroft 1990). Ces effets mesurés *in vitro* expliqueraient l'effet hypotensif *in vivo* des ouvreurs potassiques. Ils sont régulés par une large variété de neurotransmetteurs, dont certains agissent via la protéine kinase A (qui augmente l'activité des canaux) et/ou la protéine kinase C (qui diminue l'activité des canaux) (Hayabuchi *et al.*, 2001). L'étude de souris knock-out pour le gène *Kir6.2* suggère que *Kir6.2* ne contribue pas aux canaux artériels (Suzuki *et al.*, 2001), mais il semble que ce soit le rôle de *Kir6.1* (Inagaki *et al.*, 1995b).

Des études électrophysiologiques montrent que la co-expression de *Kir6.1* et de *SUR2B* reconstitue des canaux  $K_{ATP}$  activés par les NDP tel que l'UDP et inhibés par le glibenclamide, propriétés similaires à celles des canaux  $K_{ATP}$  natifs (Quayle *et al.*, 1997), également appelés les canaux  $K_{NDP}$  (Yamada *et al.*, 1997).

Des souris knock-out pour le gène *Kir6.1* (Miki *et al.*, 2002) présentent une mort prématurée associée à une élévation du segment ST suivie d'un blocage atrioventriculaire. Ces observations suggèrent que leur mort résulte d'une ischémie myocardique. Ces souris *Kir6.1*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de vasodilatation consécutive à l'application de Pinacidil mais présentent un vasospasme après l'application de methylethylergometrine, un alcaloïde qui stimule les récepteur sérotonergiques et induit la vasoconstriction des muscles vasculaires lisses.

La **Figure 20** illustre un modèle éventuel de la régulation par les canaux  $K_{ATP}$  de la réponse à la vasodilatation.



**Figure 20 :** Pendant l'ischémie ou l'hypoxie, plusieurs voies signalétiques participent à la vasodilatation du muscle vasculaire lisse. L'adénosine et l' $\alpha$ CGRP se lient aux récepteurs des protéines G ( $A_{A2}$  pour l'adénosine et CGRP-1 pour l' $\alpha$ CGRP) et activent ainsi la PKA. Les changements métaboliques résultants d'une ischémie ou d'une hypoxie diminuent les concentrations intracellulaires d'ATP. La conjugaison de ces deux effets permet l'ouverture de canaux  $K_{ATP}$ , qui hyperpolarise la membrane cellulaire et ferme donc les canaux VDCC. La diminution de  $Ca^{2+}$  intracellulaire diminue le tonus musculaire et autorise ainsi la vasodilatation.

(Miki et Seino, 2005)

## 5.4 Les canaux $K_{ATP}$ dans d'autres organes ou compartiments cellulaires

### 5.4.1 Le rein

Dans le système rénal, des canaux  $K_{ATP}$  sont présents au niveau du tubule proximal et dans l'appareil juxta-glomérulaire. En conditions physiologiques, ces canaux ont une forte probabilité d'ouverture et jouent un rôle important dans la réabsorption d'électrolytes et de solutés aussi bien que dans l'homéostasie du  $K^+$ . Le rôle physiologique de leur sensibilité aux nucléotides n'est pas très clair ; une hypothèse serait le couplage de l'activité du canal à celle de la pompe Na-K-ATPase, ce qui assurerait un transport vectoriel coordonné. En cas d'ischémie, cependant, la réduction du rapport ATP/ADP devrait augmenter la probabilité d'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  indépendamment de l'activité de la pompe ; ceci

est particulièrement dangereux dans le tubule proximal où 60 à 70 % de l'ultrafiltrat glomérulaire est réabsorbé (revue de Quast, 1996).

### **5.4.2 La mitochondrie**

Un autre type de canaux  $K_{ATP}$  a été mis en évidence dans la membrane interne des mitochondries du foie grâce à la mesure de courants potassiques inhibés par l'ATP et par les sulfonylurées (Inoue *et al.*, 1991). Des études ont montré que ces canaux sont sensibles au diazoxide (de l'ordre du micromolaire), alors que les canaux du sarcolemme y sont insensibles (Garlid *et al.*, 1996). En 1998, Liu *et al.* ont confirmé la cardioprotection par le diazoxide de myocytes isolés de lapin et ces auteurs pensent que les canaux  $K_{ATP}$  de la mitochondrie protègent le muscle cardiaque en étant la cible de cet ouvreur potassique. Un lien entre le préconditionnement à l'ischémie, l'activité de la PKC et les canaux  $K_{ATP}$  de la mitochondrie a été démontré par des expériences utilisant le même modèle (Sato *et al.*, 1998). Le 5-hydroxydécanoate de sodium (5-HD) bloque spécifiquement les canaux  $K_{ATP}$  mitochondriaux sans agir sur les canaux cardiaques (Hu *et al.*, 1999). Ce profil pharmacologique, proche de celui des canaux recombinants SUR1/Kir6.1 (Liu *et al.*, 2001b), associé à des expériences de marquage immunologique (Suzuki *et al.*, 1997) laissent penser que ces canaux peuvent être composés de la sous-unité Kir6.1. Les mitochondries du cerveau de rat présentent également des canaux  $K_{ATP}$  (Bajgar *et al.*, 2001) qui ont un profil pharmacologique identique à celui des canaux mitochondriaux cardiaques et hépatiques. Ils pensent que ces canaux pourraient être impliqués dans la protection des dommages ischémiques au niveau du cerveau.

Cependant le diazoxide et le 5-HD ont des effets multiples indépendant des canaux  $K_{ATP}$  et les expériences montrant un rôle des canaux  $K_{ATP}$  mitochondriaux dans le préconditionnement, ou même leur existence, ne sont pas concluantes (Hanley et Daut, 2005).

### **5.4.3 Le noyau**

Le glucose, principal régulateur du pancréas, présente différents effets sur les cellules  $\beta$  pancréatiques, tels que la régulation de la sécrétion d'insuline, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'expression des gènes. Bien que la succession des événements qui lie la glycémie à la libération d'insuline soit bien décrite, le mécanisme par lequel le glucose régule les fonctions nucléaires est encore inconnu. Des canaux  $K_{ATP}$ , très semblables à ceux présents sur la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques, sont

également présents sur l'enveloppe nucléaire de ces cellules. Sur des noyaux isolés, la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  par le tolbutamide (une sulfonylurée) ou par le diadénosine polyphosphate déclenche un pulse transitoire de  $Ca^{2+}$  et induit la phosphorylation de facteurs de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding protein). En cellule entière, des expériences de fluorescence in situ révèlent que ces signaux calciques peuvent induire l'expression de c-myc. Ces résultats démontrent que la fonction du canal  $K_{ATP}$  dans le noyau est liée au métabolisme du glucose, aux signaux nucléaire de  $Ca^{2+}$ , et à la fonction nucléaire (Quesada *et al.*, 2002).

#### **5.4.4 Les cellules folliculaires**

Les cellules folliculaires entourant les ovocytes de Xénope contiennent des canaux  $K_{ATP}$  activés par le cromakalim et le pinacidil et bloqués par les sulfonylurées telles que le glibenclamide. L'activation de ces canaux par le cromakalim est drastiquement réduite ou abolie par des traitements qui stimulent la protéine kinase C (par exemple les effecteurs muscariniques, les esters de phorbol). Les gonadotropines, connues pour jouer un rôle essentiel dans la physiologie ovarienne, activent également ces canaux (Honoré et Lazdunski, 1991). Il semble que l'ouverture de ces canaux folliculaires, en hyperpolarisant l'ovocyte, contrôle la sensibilité à la progestérone, et régule ainsi les processus de division cellulaire (Wibrand *et al.*, 1992). Les ovocytes défolliculés par pelage manuel sont donc dépourvus de canaux  $K_{ATP}$ .

## **6 Régulation**

La sous-unité SUR dote les canaux  $K_{ATP}$  d'une sensibilité aux modulateurs endogènes et aux drogues pharmacologiques (Ashcroft et Gribble, 1998). Ainsi l'interaction des nucléotides liés au magnésium avec les NBD de SUR augmente l'activité des canaux  $K_{ATP}$  (Shyng *et al.* 1997b ; Gribble *et al.*, 1997a). SUR présente aussi des sites de liaisons des sulfonylurées (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995) et des ouvreurs potassiques (KCO) qui, respectivement, inhibent et activent le canal. La variété des sensibilités pharmacologiques des canaux  $K_{ATP}$  résulte de différentes isoformes de SUR (Inagaki *et al.*, 1996 ; Gribble *et al.*, 1998c).

## 6.1 Régulation physiologique

### 6.1.1 Nucléotides intracellulaires

La régulation des canaux  $K_{ATP}$  par les nucléotides est complexe, étant donné que l'activité du canal est inhibée par la liaison des nucléotides à Kir6.2 et activée par la liaison des nucléotides liés au magnésium aux deux NBD de SUR. De plus, le Mg-ATP pourrait activer des lipides et protéines kinases, et de ce fait augmenter les concentrations membranaires en phospholipides tels que le  $PIP_2$  (qui module la sensibilité des canaux à l'ATP) ou altérer l'état de phosphorylation du canal lui-même. Le mécanisme de régulation par les nucléotides du canal  $K_{ATP}$  n'en est que plus difficile à comprendre. Deux types d'expériences ont aidé à déterminer les propriétés des différents sites de liaison : le premier, la liaison d'ATP radiomarké à l'une des deux sous-unités, exprimée en absence de l'autre ; le second, des études électrophysiologiques de canaux porteur de mutations.

#### 6.1.1.1 Interaction avec Kir6.2

Etant donné que des protéines Kir, tronquées dans leur partie C-terminale, forment des canaux sensibles à l'ATP en absence de la sous-unité SUR (Tucker *et al.*, 1997), le site d'inhibition de l'ATP se situe sur la sous-unité Kir. Cependant, il n'est pas évident que les nucléotides interagissent directement sur la sous-unité Kir, étant donné que Kir ne possède aucun motif A ou B de Walker. Des études de photoaffinité, avec des analogues de l'ATP, 8-azidoATP, ATP-4-azidoanilido, 2-azidoadenosine 5'-triphosphate-biotine (2- $N_3$ -ATPbio) et l'adénosine 5'-triphosphate azidoanilidebiotine (ATP-[ $\gamma$ ]azidoanilide-bio), ont démontré que l'ATP se lie directement à Kir6.2 (Tanabe *et al.*, 1999, 2000 ; Wang *et al.*, 2002). Etant donné que chaque monomère de Kir possède son site de liaison à l'ATP, un canal devrait avoir quatre sites (Markworth *et al.*, 2000). Cependant il semble que la liaison de l'ATP à l'une des sous-unités soit suffisante pour induire la fermeture du canal (Dorschner *et al.*, 1999).

Le domaine C-terminal de Kir6.2 exprimé chez *Escherichia coli* lie un analogue de l'ATP, 2'3'-O-(2,4,6-trinitrophenylcyclo-hexadienylidene) (Vanoye *et al.*, 2002). Les mutations R50, K185, I182, R201 et G334 réduisent la sensibilité à l'ATP du canal (Tucker *et al.*, 1997, 1998 ; Drain *et al.*, 1998 ; Shyng *et al.*, 2000) et des études ont démontré une interaction directe avec les extrémités N-et C-terminales (Tucker et Ashcroft, 1999 ; Lippiat *et al.*, 2002). Ceci suggère que les deux extrémités N-et C-terminales sont impliquées dans la « poche » de liaison de l'ATP (Antcliff *et al.*, 2005).

Les mutations R50 et K185 réduisent le photomarquage de Kir6.2 par le 8-azido-ATP (Tanabe *et al.*, 1999). La substitution en cystéine et des études de modification des thiols suggèrent que les acides aminés R50 et K185 interagissent respectivement avec le phosphate  $\gamma$  et le phosphate  $\beta$  (Trapp *et al.*, 2003). Toutes ces données suggèrent que les acides aminés R50 et K185 sont impliqués dans la liaison de l'ATP.

### 6.1.1.2 Interaction avec SUR

Il est possible que SUR fonctionne comme un transporteur de substrats endogènes qui régulent le canal Kir6.2 de manière autocrine via l'extérieur de la cellule. L'autre possibilité serait que SUR soit un régulateur direct du canal Kir6.2. Le Mg-ADP stimule l'activité du canal SUR1/Kir6.2, alors qu'il bloque le canal Kir6.2 $\Delta$ C36 (Tucker *et al.*, 1997). Des mutations au niveau du Walker A (K719A et K1385M) ou du Walker B (D853N, D1506A et D1506N) des deux NBD de SUR1 abolissent l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par le Mg-ADP (Gribble *et al.*, 1997a, 1997b ; Shyng *et al.*, 1997b). Gribble *et al.* (1998b) ont également montré que le Mg-ATP active les canaux SUR1/Kir6.2 en interagissant avec les NBD de SUR1, lorsque SUR1 est co-exprimé avec Kir6.2-R50G, un mutant de Kir6.2 insensible à l'ATP. Le canal reconstitué, composé de Kir6.2-R50G et du mutant de la lysine du Walker A de SUR1, n'est pas activé par le Mg-ATP. Ainsi, le Mg-ADP et le Mg-ATP stimulent l'activité des canaux via les NBD de SUR. Si SUR fonctionnait comme un transporteur actif, au même titre que les autres protéines ABC, il devrait utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des composés. Mais la stimulation du canal par le Mg-ADP laisse penser qu'il agit plutôt comme un régulateur de l'activité du canal que comme un transporteur.

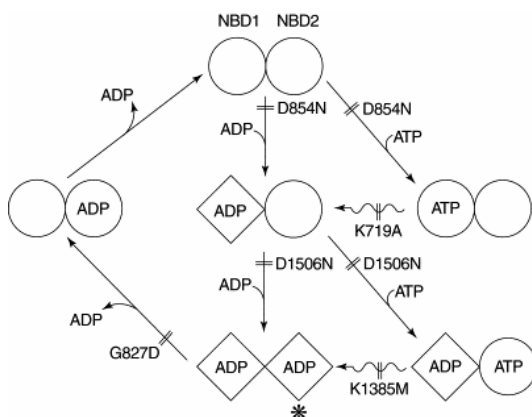
Pour élucider les bases moléculaires de la régulation du canal par SUR, les propriétés de liaison des nucléotides par les NBD de SUR1 ont été examinées à l'aide du 8-azido-[ $^{32}$ P]ATP (Ueda *et al.*, 1997). SUR1, exprimé dans des cellules COS-7, est photomarké par le 8-azido-ATP même en absence de  $Mg^{2+}$  ou de vanadate. Le marquage de SUR1 par le 8-azido-[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP ou le 8-azido-[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP est apparemment biphasique et suggère que SUR1 a deux sites de liaison à l'ATP, l'un de forte affinité, l'autre de faible affinité (Ueda *et al.*, 1997). L'analyse de mutants suggère que NBD1 est le site de forte affinité. La liaison du 8-azido-ATP au site de forte affinité est très stable à 4°C, parce qu'il ne se dissocie pas du NBD1 lorsque les fractions membranaires sont lavées par un excès de tampon froid. Chez MDR1 et MRP1, le photomarquage nécessite le  $Mg^{2+}$  et n'est stable qu'en présence de vanadate (Urbatsch *et al.*, 1995 ; Taguchi *et al.*, 1997). Les mutations du



Walker A (K719M) ou du Walker B (D854N) du NBD1 de SUR1 abolissent le photomarquage, alors que les mutations équivalentes dans le NBD2 ne l'affectent pas (Ueda *et al.*, 1997). Le *N*-éthylmaléimide (NEM), agent réducteur, inhibe le photomarquage en interagissant avec la cystéine 717 du Walker A du NBD1 (Matsuo *et al.*, 1999b).

Pour examiner plus en détail la liaison des nucléotides aux NBD, SUR, photomarké au 8-azido-ATP, a été digéré partiellement à la trypsine (Matsuo *et al.*, 1999a, 2000). Les fragments ont été immunoprécipités avec des anticorps anti-NBD1 ou anti-NBD2. Il apparaît que le NBD1 lie le 8-azido-ATP de façon indépendante du  $Mg^{2+}$  et le NBD2 de façon dépendante du  $Mg^{2+}$ , ce qui suggère que le NBD2 soit responsable de l'activation du canal par le Mg-ADP parce que les canaux  $K_{ATP}$  ne sont activés par l'ADP qu'en présence de  $Mg^{2+}$  (Gribble *et al.*, 1997b).

La mutation du NBD2 de SUR2A (K1348A) abolit l'activation du canal par le Mg-ADP (Reimann *et al.*, 2000), alors que la mutation correspondante dans le NBD1 (K707A) n'a pas d'effet. Ces mêmes mutations dans les deux NBD de SUR1 (K719A et K1385A) abolissent l'activation du canal par le Mg-ADP (Gribble *et al.*, 1997b). La mutation K719M du SUR1 affecte non seulement la liaison du 8-azido-ATP au NBD1 mais également au NBD2. La liaison du nucléotide au NBD1 doit être importante pour l'activation par le Mg-ADP en affectant la liaison du nucléotide au NBD2 (**Figure 21**).



**Figure 21** : Modèle de l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par les nucléotides Mg-ADP (ou Mg-ATP). L'ion  $Mg^{2+}$  a été omis pour plus de clarté. Les cercles indiquent les NBD inactifs et les losanges les NBD ayant fixé l'ADP. L'astérisque indique un état actif dans lequel le NBD est capable de potentialiser l'activité du canal. Les flèches rectilignes indiquent les réactions de liaison, les flèches courbées les réactions d'hydrolyse. Les mutations prédites pour interférer avec le cycle sont figurées par une double barre.

(Ashcroft et Gribble, 1998)

Le NBD2 de SUR est photomarké par le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  mais pas par le 8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  à 37°C, alors que le NBD1 est marqué par les deux (Matsuo *et al.*, 1999a,

2000). Ceci suggère que le NBD2 possède une activité ATPase et le Mg-ATP lié est hydrolysé en Mg-ADP, alors que l'activité du NBD1 est très faible, voire inexistante. Lors de ces expériences de photomarquage on ne peut quantifier l'activité ATPase. Le NBD2 de SUR2 fusionné à la protéine maltose-binding (MPB) présente une activité ATPase plus forte que cette même protéine fusionnée au NBD1 (Bienengraeber *et al.*, 2000 ; Zingman *et al.*, 2001) mais tout de même plus faible que celle du NBD2 de SUR1 (Masia *et al.*, 2005). Les canaux SUR2A/Kir6.2 immunoprécipités à partir de membranes cellulaires cardiaques ont une activité ATPase de 31 nmol/min/mg contre 320 à 3900 nmol/min/mg pour MDR1 (Shapiro et Ling, 1998) et 460 nmol/min/mg pour MRP1 (Chang *et al.*, 1997). L'activité ATPase de CFTR est également très faible de 50 à 70 nmol/min/mg (Li *et al.*, 1996). La faible activité ATPase de SUR confirme à nouveau son rôle de régulateur d'un canal potassique plutôt que celui d'un transporteur.

### 6.1.1.3 *Coopération entre les deux NBD*

Comme décrit plus haut, le 8-azido-ATP se lie toujours au NBD1 de façon stable en présence de  $Mg^{2+}$  après plus de 15 min à 4°C (Ueda *et al.*, 1999). Pour analyser les interactions de SUR1 avec les nucléotides, deux procédures ont été utilisées : une procédure de pré-incubation et une procédure de post-incubation. Tout d'abord les protéines sont incubées dans l'ADP à 4°C, ensuite elles réagissent au 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP en présence d'ADP (procédure de pré-incubation). Dans ce cas, l'ADP, en présence de  $Mg^{2+}$ , antagonise fortement la liaison du 8-azido-ATP. Cet effet est réduit si l'on mute le NBD2. Par contre, l'ADP antagonise faiblement la liaison du 8-azido-ATP en absence de  $Mg^{2+}$ . Le Mg-ADP lié au NBD2 doit faciliter la liaison du Mg-ADP au NBD1 et de ce fait empêcher la liaison du 8-azido-ATP au NBD1. Les deux NBD de SUR1 doivent coopérer.

Dans la procédure post incubation les protéines sont tout d'abord incubées dans le 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP à 37°C pendant 3 min puis lavées. Ensuite les protéines sont incubées 15 min en absence ou en présence de nucléotides froids et irradiées aux UV. Le Mg-ADP ou le Mg-ATP stabilisent la liaison du 8-azido-ATP, mais celui-ci a tendance à se dissocier en présence de  $Mg^{2+}$  seul à 37°C. Les effets du Mg-ADP ou du Mg-ATP dépendent de la concentration (de 10  $\mu$ M à 0.5 mM). L'ATP- $\gamma$ S, faiblement hydrolysable, n'a pas plus d'effet stabilisateur que le  $Mg^{2+}$  seul. Des mutations dans le Walker A et le Walker B du NBD2 n'ont presque pas d'effet sur la première liaison du 8-azido-ATP mais abolissent l'effet stabilisateur du Mg-ADP. Ces résultats suggèrent que le Mg-ADP, soit par liaison directe au NBD2, soit par hydrolyse du Mg-ATP lié, induit un changement de

conformation du NBD2 qui transmet un changement de conformation au NBD1 pour stabiliser la liaison de l'ATP. Une coopérativité similaire a été montrée chez les NBD de SUR2A et de SUR2B (Matsuo *et al.*, 2000). Zingman *et al.* (2002) pensent que la coopération entre les NBD est essentielle à l'ouverture du canal.

Parce que les deux NBD de SUR1 exprimés chez *Escherichia coli* forment un dimère (Hough *et al.*, 2002), la coopération des deux NBD doit être dictée par une interaction et une communication directe entre les NBD.

#### 6.1.1.4 Différences d'interaction avec les nucléotides entre les différents isoformes de SUR

Certaines propriétés de liaison des nucléotides sont similaires chez tous les isoformes : (1) le NBD1 lie les nucléotides de façon indépendante du  $Mg^{2+}$  (2) le NBD2 lie les nucléotides de façon dépendante du  $Mg^{2+}$  (3) le 8-azido-ATP se lie de façon stable au NBD1 et ne s'en dissocie pas à 4°C (4) la liaison du Mg-ATP ou du Mg-ADP au NBD2 stabilise la liaison du 8-azido-ATP au NBD1 (5) le NBD2 présente une légère activité ATPase, alors que celle NBD1 est très faible. Cependant les affinités des NBD pour les nucléotides diffèrent selon l'isoforme considéré (**Tableau 4**). Les NBD de SUR1 présentent une plus forte affinité que ceux de SUR2B, eux-mêmes que ceux de SUR2A (Matsuo *et al.*, 2000).

Isoforme SUR	NBD	Ki ( $\mu$ M) ATP	Ki ( $\mu$ M) ADP
SUR1	1	$4.4 \pm 3.7$	$26 \pm 8.6$
	2	$60 \pm 26$	$100 \pm 26$
SUR2A	1	$110 \pm 41$	$86 \pm 23$
	2	$120 \pm 39$	$170 \pm 70$
SUR2B	14	$51 \pm 13$	$66 \pm 7.5$
	2	$38 \pm 26$	$67 \pm 40$

**Tableau 4 :** Les différentes affinités des NBD pour les nucléotides suivant l'isoforme de SUR considéré (Matsuo *et al.*, 2000).

Ces différences d'affinité sont probablement reliées aux différences de régulation des canaux  $K_{ATP}$ .

### 6.1.2 Dinucléotides polyphosphates

Les dinucléotides polyphosphates (ApnA), qui seraient des molécules de signalisation impliquées dans le maintien des fonctions cellulaires vitales, ciblent également les canaux  $K_{ATP}$  pour alerter la cellule en cas de stress. Le potentiel et l'efficacité de l'inhibition de l'activité des canaux  $K_{ATP}$  par l'ApnA a d'abord été décrite pour les canaux cardiaques. Les taux normaux d'ApnA dans le cœur maintiennent une faible probabilité d'ouverture des canaux, mais l'ischémie induit une forte chute de ces taux (dix fois) ce qui conduit à une forte probabilité d'ouverture des canaux. L'action inhibitrice de l'ApnA dépend de la présence de nucléotides diphosphates (Jovanovic *et al.*, 1997).

### 6.1.3 Phospholipides

Les phospholipides membranaires tels que  $PIP_2$  et  $PIP_3$  interagissent avec les canaux  $K_{ATP}$  pour augmenter leur probabilité d'ouverture et réduire leur sensibilité à l'ATP (Baukrowitz et Fakler, 2000 ; Baukrowitz *et al.*, 1998 ; Fan et Makielski, 1997, 1999 ; Hilgemann et Ball, 1996 ; Shyng et Nichols, 1998). Ceci a été montré par des applications directes de PIPs sur des patch excisés de canaux  $K_{ATP}$ . De plus, l'ajout de PI5-kinase, qui augmente les quantités de  $PIP_2$ , réduit la sensibilité à l'ATP (Shyng *et al.*, 2000), alors que l'ajout de phospholipase C, qui hydrolyse le  $PIP_2$ , augmente la sensibilité à l'ATP des ces canaux (Xie *et al.*, 1999).

Les effets des PIPs sont dictés principalement via la sous-unité Kir6.2, parce que Kir6.2 $\Delta$ C36 exprimé seul à la membrane en absence de sous-unité SUR présente également une sensibilité à l'ATP réduite lors de l'application de  $PIP_2$  (Baukrowitz *et al.*, 1998) bien que la liaison directe du  $PIP_2$  aux canaux Kir ait déjà été démontrée (Huang *et al.*, 1998). Cependant, SUR pourrait moduler la sensibilité au  $PIP_2$ , en changeant peut-être la probabilité d'ouverture du canal (Song et Ashcroft, 2001). Il semble que le  $PIP_2$  peut avoir un effet direct sur la sensibilité du canal à l'ATP et un effet indirect qui est la conséquence d'une altération de l'ouverture du canal (Fan et Makielski, 1999).

Le « rundown » qui apparaît en patch excisé, pour les courants natifs comme pour les recombinants est partiellement éliminé par l'application de Mg-ATP (Findlay et Dunne, 1986 ; Ohno-Shosaku *et al.*, 1987 ; Xie *et al.*, 1999) ; le  $PIP_2$  serait également impliqué dans cet effet (Xie *et al.*, 1999). On pense que le  $PIP_2$  est produit dans la membrane plasmique par une série de phosphorylations du phosphatidylinositol (PI) et que ce

processus est catalysé par la PI4-kinase et la PIP-kinase. La synthèse des phospholipides à partir de Mg-ATP a ainsi des effets multiples mais reliés à l'activité du canal  $K_{ATP}$ .

L'acylCoA a un puissant effet stimulant qui s'oppose à l'effet inhibiteur de l'ATP et qui pourrait indirectement affecter l'activité de la PKC (Liu *et al.*, 2001a)

#### **6.1.4 Phosphorylation**

La phosphorylation du domaine R de CFTR par la protéine kinase A (PKA) est nécessaire à l'activité du canal (Gadsby et Nairn, 1999). SUR possède une succession d'acides aminés chargés négativement dans cette même région, augmentant la possibilité qu'ils puissent jouer le même rôle que le domaine R phosphorylé. L'activité des canaux  $K_{ATP}$  est également régulée par des protéines kinases, même si les effets ne sont pas aussi marqués que pour CFTR. La PKA stimule l'activité des canaux natifs et recombinants (Light, 1996), alors que la PKC réduit l'activité des canaux du muscle lisse. La phosphorylation par la PKA ou la PKC de Kir6.2 influence la sensibilité à l'ATP et/ou la probabilité d'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  (Béguin *et al.*, 1999 ; Light *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2000). Il semble que la phosphorylation de SUR soit impliquée dans la régulation du canal. La protéine SUR1 humaine possède quatre sites consensus de phosphorylation par la PKA. La phosphorylation par la PKA de SUR1 (sur S1571) diminue la durée du burst, l'intervalle entre les burst et la probabilité d'ouverture des canaux SUR1/Kir6.2 (Béguin *et al.*, 1999).

Par ailleurs Hu *et al.* (2003) ont montré que la PKC permet de réguler le nombre de canaux  $K_{ATP}$  à la membrane. Un motif di-leucine (distinct du site de phosphorylation) sur la sous-unité Kir6.2 permet l'internalisation des canaux, ce qui limite ainsi leur activité.

#### **6.1.5 Sphingoglycolipides**

Le sulfatide est un sphingoglycolipide présent dans le système nerveux (central et périphérique) et dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, au niveau des granules de sécrétion. Il est nécessaire à la sécrétion d'insuline (Buschard *et al.*, 2002) : l'augmentation de la concentration de sulfatide active les canaux  $K_{ATP}$  en stimulant une voie de sécrétion de l'insuline indépendante des canaux  $K_{ATP}$  mais dépendante du  $Ca^{2+}$ . Cette sécrétion est inhibée lorsqu'on incube les cellules  $\beta$  pancréatiques avec des anticorps anti-sulfatide. Le sulfatide, libéré en même temps que l'insuline, pourrait exercer un feed-back négatif sur la sécrétion d'insuline.

### 6.1.6 Protéines G

Plusieurs études rapportent que l'activité du canal  $K_{ATP}$  est régulée par les protéines G. Ainsi  $G_\alpha$  stimule les canaux Kir6.2/SUR1 et Kir6.2/SUR2A alors que les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  n'ont pas d'effet (Sanchez *et al.*, 1998). Au contraire, d'autres études suggèrent que les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  réduisent l'inhibition par l'ATP des canaux Kir6.2/SUR2A en interagissant avec SUR2A (Terzic *et al.*, 1994 ; Wada *et al.*, 2000).

### 6.1.7 Hormones

La galanine (Dunne *et al.*, 1989) et la somatostatine sécrétées par les cellules  $\delta$  pancréatiques (de Weille *et al.*, 1989) inhibent la sécrétion d'insuline en activant les canaux  $K_{ATP}$  par un mécanisme impliquant les protéines  $G_i$  (ce mécanisme est inhibé par la toxine pertussique qui bloque les protéines  $G_i$ ). L'ADH, hormone hypophysaire, inhibe les canaux  $K_{ATP}$  et permet la sécrétion d'insuline (Martin *et al.*, 1989).

Les canaux  $K_{ATP}$  cardiaques sont activés par l'acétylcholine et les agonistes  $\beta$  adrénergiques. L'acétylcholine fait intervenir des protéines G alors que les agonistes  $\beta$  adrénergiques stimulent l'adénylate cyclase via des protéines  $G_s$  et diminuent indirectement les concentrations d'ATP intracellulaires (Terzic *et al.*, 1995).

Le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) active les canaux  $K_{ATP}$  du muscle lisse (Nelson *et al.*, 1990) probablement via une protéine G (Nelson *et al.*, 1995).

L'hyperpolarisation des neurones hypothalamiques, conséquence de l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par la leptine ou par l'insuline (par une voie faisant intervenir la PI3-Kinase) permettrait de réguler l'appétit (Spanswick *et al.*, 1997, 2000).

### 6.1.8 pH intracellulaire

L'effet du pH sur l'activité des canaux  $K_{ATP}$  est très controversé.

Un pH inférieur à 6.7 diminuerait la probabilité d'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  pancréatiques (Proks et Ashcroft, 1993), cardiaques et du muscle squelettique (Koyano *et al.*, 1993 ; Davies *et al.*, 1992 ; Vivaudou et Forestier, 1995) en absence d'ATP alors qu'il augmenterait cette probabilité d'ouverture en présence de 10 à 100  $\mu$ M d'ATP. Une modification de la concentration en ATP libre (Ashcroft et Ashcroft, 1990) ou une modification de la sensibilité à l'ATP (Vivaudou et Forestier, 1995) pourraient en être la cause.

L'observation, selon laquelle des mutations de Kir6.2 qui affectent sa sensibilité à l'ATP (K185E) n'affectent pas la sensibilité au pH et inversement des mutations de Kir6.2 qui affectent la sensibilité au pH (H175K) mais n'affectent pas la sensibilité à l'ATP (Xu *et al.*, 2001), conduit les auteurs à penser que la sensibilité des canaux aux protons n'est pas gouvernée par l'ATP mais qu'elle peut être modulée par l'ATP. L'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  résultant de la diminution du pH lors d'une acidose contribuerait à la protection de la cellule.

### 6.1.9 Cytosquelette

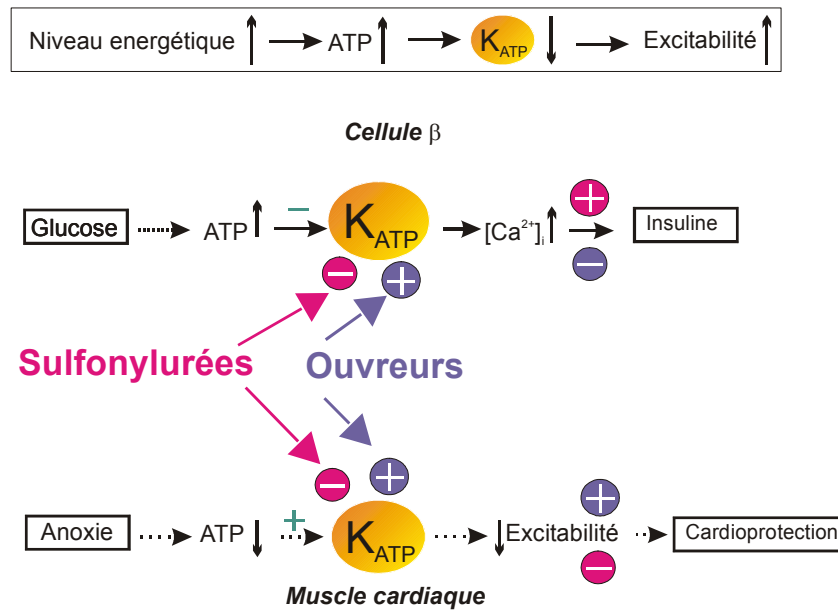
Le traitement à la trypsine des canaux  $K_{ATP}$  affecte leurs mécanismes de régulation : activation par le Mg-ADP et les ouvreurs, inhibition par les sulfonylurées (Proks et Ashcroft, 1993). Il semble que des composants cytosoliques interviennent dans ces mécanismes de régulation, étant donné que l'activité des canaux diminue au cours du temps en patch excisé (phénomène de run-down). L'application de cytochalasine ou de désoxyribonucléase I (agents dépolymérisant les filaments d'actine) sur la face interne de patch excisés de myocytes cardiaques accélère le run-down, alors que l'application de phalloïdine (stabilisateur d'actine) ou d'actine F restaure l'activité des canaux (Furukawa *et al.*, 1996). De plus, le traitement des canaux à la DNaseI, qui empêche la formation des filaments d'actine, s'oppose à l'inhibition des canaux par l'ATP, et ce uniquement en présence d'ATP (Terzic et Kurachi, 1996) et par les sulfonylurées (Yokoshiki *et al.*, 1997). Le réseau des filaments d'actine régulerait donc bien les canaux  $K_{ATP}$ .

### 6.1.10 Autres

Les  $K_{ATP}$  peuvent être régulés par l'oxyde nitrique (NO), l'adénosine, des stimuli adrénergiques (Chutkow *et al.*, 2002) et autres protéines de stress. Ces régulations se font au travers de voies de signalisation qui nécessitent encore d'être clarifiées.

## 6.2 Régulation pharmacologique

La **Figure 22** illustre les effets de la régulation pharmacologique des canaux  $K_{ATP}$  s'exprimant dans les cellules  $\beta$  du pancréas ou dans le muscle cardiaque.



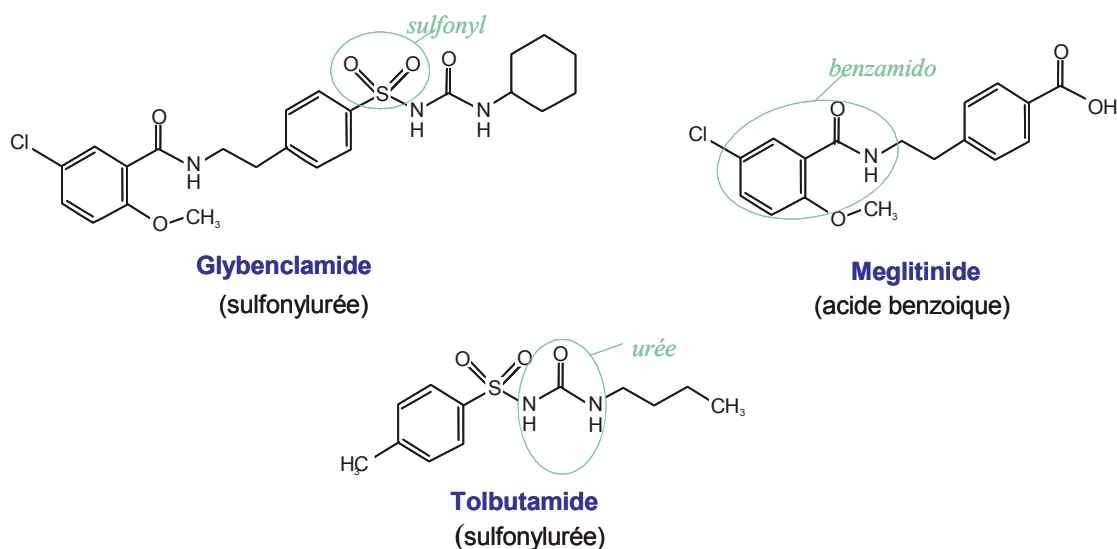
**Figure 22 :** Effets des inhibiteurs (sulfonylurées) et des activateurs (ouvreurs) des canaux  $K_{ATP}$  en fonction du tissu considéré.

### 6.2.1 Inhibiteurs : les sulfonylurées et autres composés

Les inhibiteurs des canaux  $K_{ATP}$  se répartissent en deux groupes : ceux qui interagissent avec Kir6.2 et ceux qui interagissent avec SUR1. Toutes ces molécules stimulent la sécrétion d'insuline et certaines sont utilisées dans le traitement du diabète de type II. Les imidazoles, telles que la phentolamine et la cibenzoline se lient à Kir6.2 (Mukai *et al.*, 1998 ; Proks et Ashcroft, 1997). Les sulfonylurées (tolbutamide, gliclazide, glimepiride) et les dérivés benzamido (meglitinide) se lient à SUR1 avec une forte affinité (voir revue Ashcroft et Gribble, 1999). Les sulfonylurées interagissent avec Kir6.2 avec une faible affinité (Gribble *et al.*, 1997b, 1998c), mais les concentrations requises sont beaucoup plus importantes que celles trouvées dans le sang des patients traités par ces drogues.

De faibles concentrations de tolbutamide bloquent les canaux  $K_{ATP}$  exprimant la sous-unité SUR1, mais pas ceux exprimant SUR2A ou SUR2B (Gribble *et al.*, 1998c). Au contraire le meglitinide bloque les trois types de canaux. Ceci pourrait indiquer que les sulfonylurées (tel que le tolbutamide) interagissent avec un site de liaison spécifique à SUR1, alors que les composés benzamido (tel que le meglitinide) interagissent avec un site commun à tous les isoformes SUR. On pense que le glibenclamide, qui comprend une moitié sulfonylurée et une moitié benzamido, interagit sur deux sites de SUR1 et un seul de SUR2 (**Figure 23**).





**Figure 23 :** Formules développées des inhibiteurs utilisés au laboratoire.

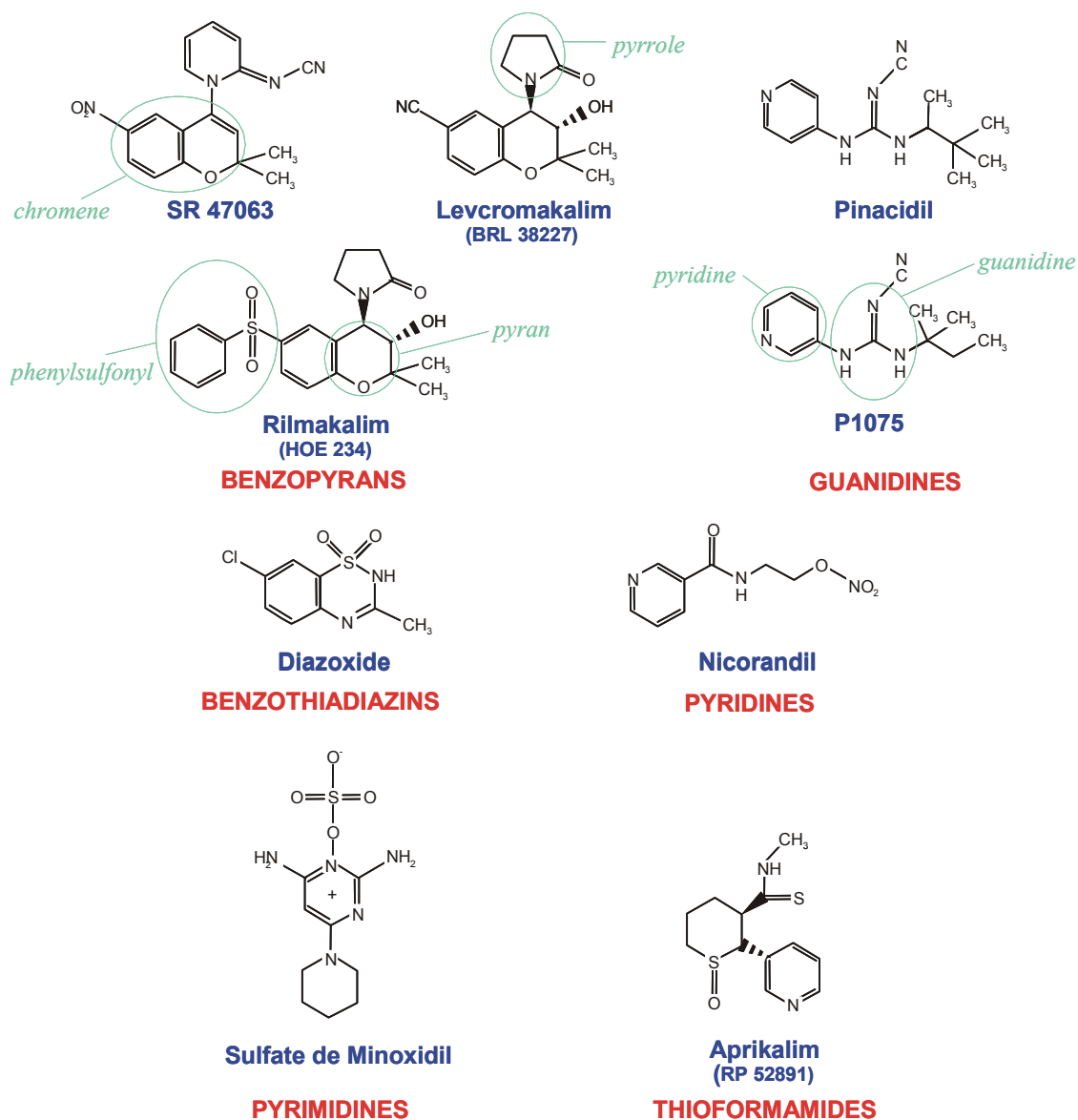
Les différences d'affinité de SUR1/Kir6.2 et de SUR2/Kir6.2 pour le tolbutamide ont été exploitées pour localiser son site de liaison par une approche chimérique (Ashfield *et al.*, 1999 ; Babenko *et al.*, 1999). Ces études montrent que les hélices transmembranaires 14 à 16 de SUR1 sont requises pour une forte affinité d'inhibition par le tolbutamide et que la sérine 1237, qui se situe dans la boucle cytoplasmique entre les hélices transmembranaires 15 et 16, est cruciale pour la haute affinité du blocage. Ceci confirme de précédentes études qui suggéraient que le site de liaison est intracellulaire (Lee *et al.*, 1994 ; Schwanstecher *et al.*, 1994).

Une approche différente a montré que seules les boucles intracellulaires entre les hélices transmembranaires 5 et 6 d'une part et 15 et 16 d'autre part, sont nécessaires pour la liaison du [ $^3\text{H}$ ]-glibenclamide (Mikhailov *et al.*, 2001). Il a été suggéré que la boucle entre les hélices transmembranaires 15 et 16 est le site de liaison du groupe sulfonylurée et que la boucle intracellulaire entre les hélices 5 et 6 est le site de liaison du groupe benzamide (Ashfield *et al.*, 1999 ; Babenko *et al.*, 1999 ; Mikhailov *et al.*, 2001). Par ailleurs, les hélices transmembranaires 14 à 16 pourraient être impliquées dans la transduction de la liaison du sulfonylurée à l'inhibition du canal. Cependant le mécanisme moléculaire de la fermeture des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$  par la liaison du sulfonylurée à SUR n'est pas clair. Le glibenclamide (de l'ordre du nM) n'affecte pas l'affinité des deux NBD au Mg-ATP ou au Mg-ADP. Lorsque SUR1, ayant lié le 8-azido-ATP au NBD1, est incubé avec le glibenclamide en présence de 0.5 mM de Mg-ATP ou de Mg-ADP, le photomarquage est

réduit par le glibenclamide de façon proportionnelle à la concentration (Ueda *et al.*, 1999), ce qui suggère que le glibenclamide module l'interaction coopérative entre les deux NBD de SUR1. Ainsi, le glibenclamide pourrait convertir l'état actif de SUR directement en un état inactif en dissociant l'ATP du NBD1.

### **6.2.2 Activateurs : les ouvreurs potassiques**

Les ouvreurs potassiques (KCO) sont des molécules de structures très diverses qui présentent la propriété commune d'activer les canaux  $K_{ATP}$ , et de ce fait, d'hyperpolariser la membrane plasmique et de réduire son excitabilité électrique. (Ashcroft et Gribble, 2000). Ils comprennent le diazoxide, le cromakalim, le pinacidil et le nicorandil (**Figure 24**). Aucune de ces molécules n'est très répandue pour l'usage clinique, même si le diazoxide est utilisé pour supprimer une sécrétion excessive d'insuline, le minoxidil sulfate est utilisé localement pour stimuler la pousse des cheveux et le nicorandil est en essai clinique pour le traitement de l'angine. Les différentes isoformes de SUR présentent des sensibilités variables aux KCO. Ainsi, en présence de Mg-ATP intracellulaire, les canaux SUR1/Kir6.2 sont stimulés par le diazoxide mais pas par le pinacidil ou le cromakalim, alors que les canaux SUR2A/Kir6.2 sont stimulés par le pinacidil et le cromakalim mais pas par le diazoxide et les canaux SUR2B/Kir6.2 sont stimulés par les trois (Babenko *et al.*, 1998 ; D'hahan *et al.*, 1999a, 1999b ; Gribble *et al.*, 1998c ; Inagaki *et al.*, 1995a, 1996 ; Isomoto *et al.*, 1996).



**Figure 24** : Formules développées d'ouvriers potassiques représentatifs.

Les KCO interagissent avec les nucléotides de façon complexe. En particulier, l'ATP est requis pour la liaison de l'analogue du pinacidil [ $^3\text{H}$ ]-P1075 (Hambrock *et al.*, 1998, 1999), même si le canal peut être activé par le P1075 sans ajout de nucléotides (Gribble *et al.*, 2000 ; Reimann *et al.*, 2000 ; Terzic *et al.*, 1995). La rapide dissociation de l'ouvreur en absence de Mg-ATP (Gribble *et al.*, 2000) pourrait signifier qu'il est plus difficile de mesurer la liaison du P1075 en absence de nucléotides, avec l'alternative que l'ATP puisse rester lié au NBD1 quelque temps après l'excision du patch dans les expériences d'électrophysiologie. Des études indiquent que les KCO, tel que le pinacidil, stimulent l'hydrolyse de l'ATP au NBD2 (Bienengraeber *et al.*, 2000) et ils facilitent l'ouverture du

canal en le stabilisant dans une conformation Mg-nucléotide lié (Zingman *et al.*, 2001). Réciproquement, les agents tels que la créatine kinase, qui favorisent le retrait du Mg-ADP, entraînent la fermeture du canal (Zingman *et al.*, 2001). Le fait que les KCO stimulent l'activité ATPase de SUR suggère que ces protéines ABC pourraient transporter les KCO à travers la membrane, au même titre que les substrats de MDR1 ou de MRP1 qui induisent l'activité ATPase de ces transporteurs. Cependant, aucune fonction de transport n'a encore été démontrée pour SUR.

Le site de liaison des KCO ayant pour cible SUR2 (par exemple le cromakalim, le pinacidil ou le P1075) a tout d'abord été localisé dans le troisième domaine transmembranaire (Babenko *et al.*, 2000 ; D'hahan *et al.*, 1999a ; Uhde *et al.*, 1999) puis a ensuite été affiné à l'hélice transmembranaire 17. Deux résidus de cette hélice jouent un rôle important : L1249 et T1253 de SUR2A (Moreau *et al.*, 2000). D'une manière intéressante, les hélices transmembranaires 12 à 17 sont également impliquées dans la reconnaissance des substrats de MDR et de MRP (Hafkemeyer *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2001a, 2001b ; Loo et Clarke, 2001). Le site de liaison du diazoxide est encore incertain. Cette molécule se lie aux récepteurs SUR1 et SUR2, étant donné qu'elle peut activer les canaux SUR1/Kir6.2 et SUR2B/Kir6.2 en présence de Mg-ATP. De plus, même si le diazoxide n'active pas les canaux SUR2A/Kir6.2 dans ces conditions, il augmente l'activité du canal en présence de Mg-ADP, ce qui implique qu'il se lie également à SUR2A (D'hahan *et al.*, 1999b). Le site de liaison du diazoxide est donc commun aux trois isoformes et il semble que la liaison du Mg-ADP, probablement au NBD2, soit requise pour l'action de la drogue. Les différents effets du Mg-ATP sur l'activation par le diazoxide confirment l'idée selon laquelle cette drogue stimule l'activité ATPase du NBD2 de SUR1 et de SUR2B mais pas de SUR2A.



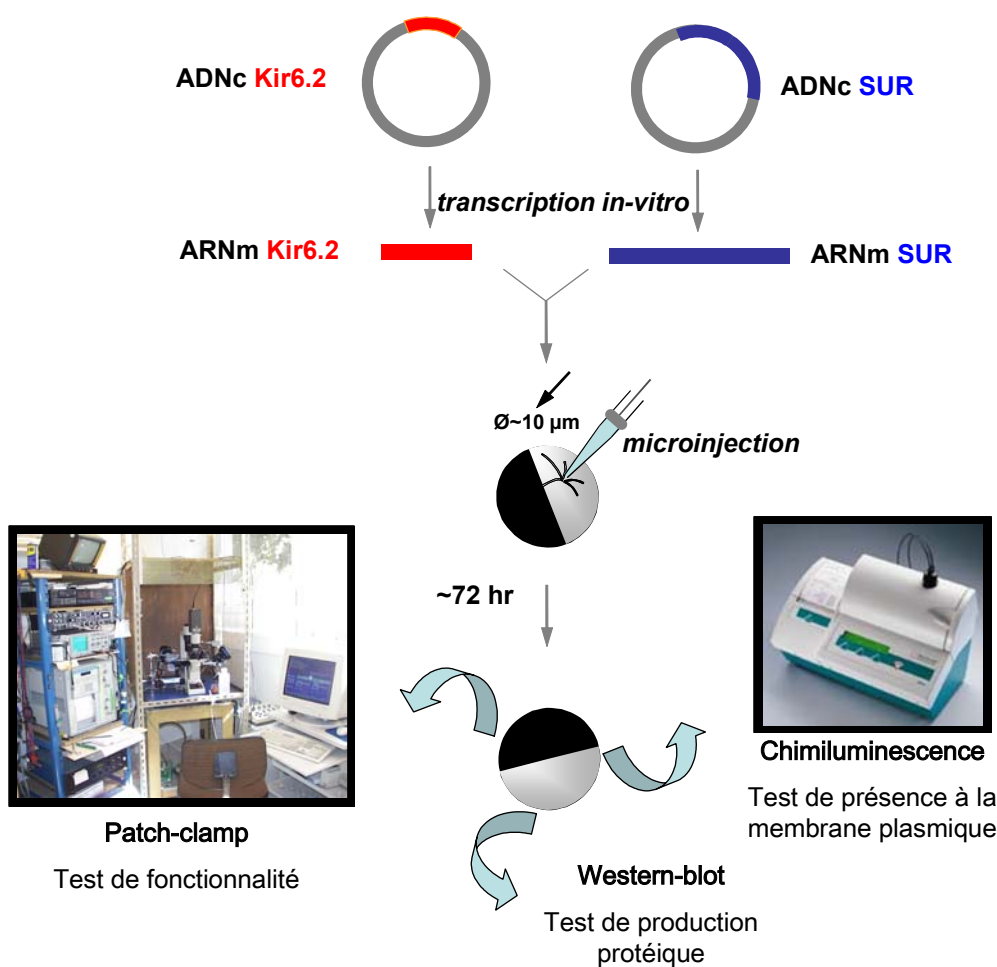
## *Matériel et méthodes*



Différentes approches expérimentales nous permettent de produire, d'exprimer nos canaux ioniques et d'en caractériser la fonctionnalité :

- une première approche de biologie moléculaire permet de produire les ADN et ARNm codant pour nos protéines modifiées,
- ces ARNm sont ensuite injectés dans l'ovocyte de Xénope, véritable usine de traduction, qui assure l'expression hétérologue de nos protéines membranaires,
- la présence de ces protéines au sein de la cellule est détectée par western-blot,
- leur adressage à la membrane plasmique est mesuré par chimiluminescence,
- enfin l'activité de nos canaux est testée par patch-clamp.

La **Figure 25** résume les différentes étapes de l'étude de nos canaux ioniques.



**Figure 25** : Représentation schématique des différentes approches expérimentales permettant l'étude des canaux  $K_{ATP}$  modifiés



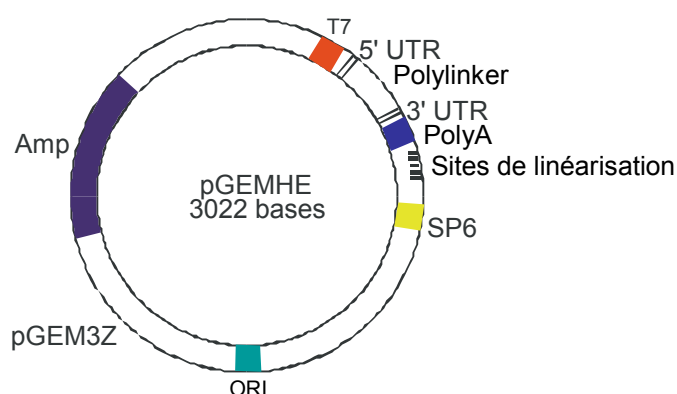
# 1 Biologie moléculaire

Les deux sous-unités (SUR2A et Kir6.2) ont été clonées dans des vecteurs d'expression spécifiques de l'ovocyte de Xénope. Deux techniques de PCR nous ont permis de modifier les protéines d'intérêt : la SOE (Splicing by Overlap Extension) ou la mutagenèse dirigée. Le matériel génétique est alors amplifié par culture bactérienne. L'ARNm est ensuite produit par transcription *in vitro*.

## 1.1 Clones et vecteurs d'expression

Les clones de SUR2A Rat (1545 ac.am., GenBank accession No D83598) et de Kir6.2 Souris (390Ac.am., GenBank accession No D50581) ont aimablement été fournis par le Docteur S. Seino (Chiba University School of Medicine, Japan).

Ces deux gènes ont été sous-clonés respectivement dans les vecteurs pGEMHE (fourni par le Docteur Logothetis, Sinai Hospital, USA) et pGEMHE2 (créé au laboratoire par le Docteur F. Pagès). Il s'agit de vecteurs d'expression dérivés du vecteur commercial pGEM3Z de chez Promega adapté à l'expression protéique dans l'ovocyte de Xénope (*Figure 26*).



**Figure 26 :** Représentation schématique du vecteur d'expression protéique dans l'ovocyte de Xénope pGEMHE.

*ORI* désigne l'origine de réplication d'un plasmide bactérien. Le promoteur T7 (SP6 en reverse) permet la transcription de l'ADN inséré au niveau du polylinker entre les séquences 3' et 5' du gène de la  $\beta$ -globine, parties non traduites (*utr* : *untranslated*) qui induisent considérablement l'expression de protéines exogènes dans l'ovocyte de Xénope. Une queue poly-A précède un ensemble de sites de restriction permettant la linéarisation du plasmide avant transcription en ARN. La sélection

*des clones est possible grâce au gène Amp<sup>R</sup> de la  $\beta$ -lactamase **qui confère la résistance à l'ampicilline.***

## 1.2 Construction des plasmides

Dans le cadre de notre étude sur la spécificité de fonction des NBD, il a été nécessaire de comprendre si cette spécificité et l'interdépendance des NBD résultent de la séquence des NBD ou de leur localisation au sein de la protéine SUR. L'approche envisagée a donc consisté à intervertir les domaines NBD par la technique de SOE et à observer les effets sur la régulation des canaux par la méthode du patch-clamp.

Nos études nous ont également amené à considérer l'importance de certains acides aminés, importance qui peut être analysée par l'effet de mutations ponctuelles réalisées par mutagenèse dirigée.

### 1.2.1 Splicing by Overlap Extension SOE

La SOE ou « Splicing by Overlap Extension » a été mise au point dans les années 90 (Horton et coll., 1989 ; Warrens et coll., 1997). Cette méthode « d'épissage par extension d'amorces hybrides » est une approche basée sur la technique de PCR pour la recombinaison de deux molécules d'ADN à des jonctions précises. Ce ré-arrangement ne nécessite pas l'introduction de nouveaux sites de restriction.

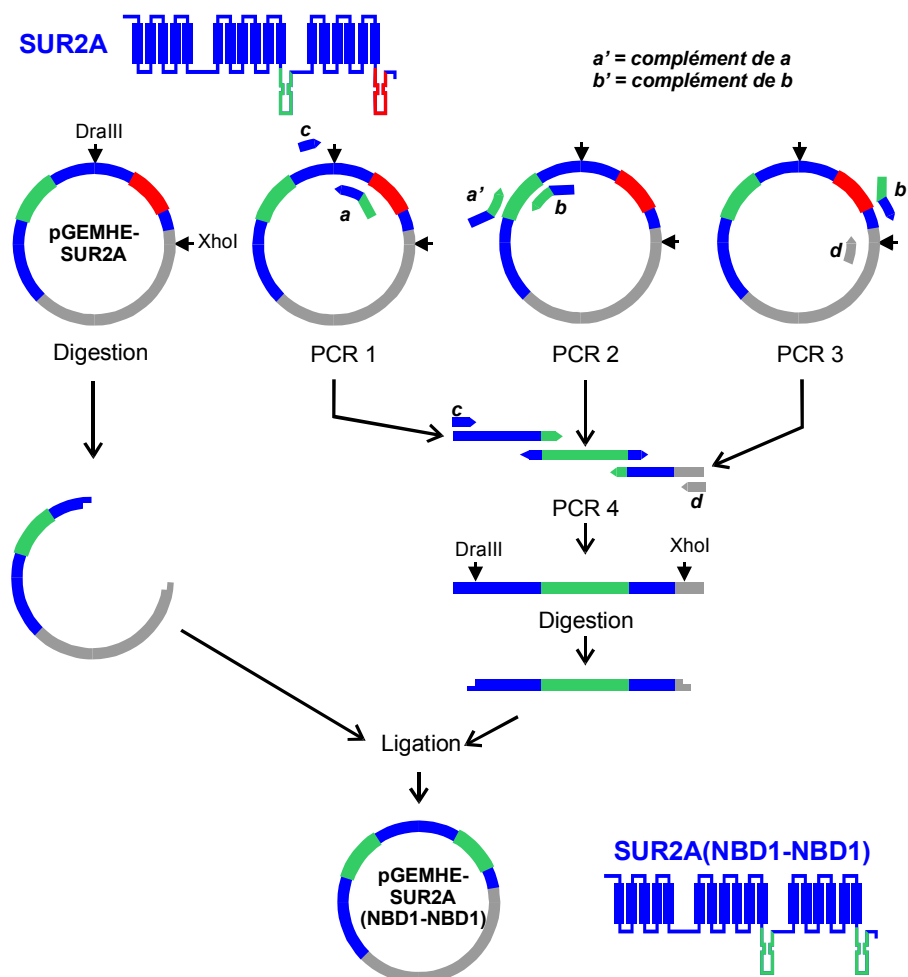
Le principe de cette réaction est illustré sur les **Figure 27** et **Figure 28**. Avec la SOE, trois fragments d'ADN provenant de gènes distincts sont assemblés.

Quatre oligonucléotides hybrides (a et son complémentaire a' ainsi que b et son complémentaire b') servant à la recombinaison sont conçus pour chevaucher la jonction de ces trois fragments. Trois réactions PCR ont lieu en parallèle pour générer trois molécules. Elles sont ensuite mélangées pour générer une nouvelle molécule hybride, recombinée par chevauchement, dans une quatrième réaction. Entre les deux cycles de PCR, la taille des ADN est vérifiée sur gel. Les deux fragments sont purifiés (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN). Dans la quatrième réaction, où l'on réunit les trois premiers fragments, une seule hybridation entre ceux-ci fournit des extrémités 3'OH accessibles à la polymérase (enzyme Vent, Biolabs) ; chacun des brins sert alors d'amorce pour produire le fragment chimérique qui sera amplifié avec les amorces c et d.

Les autres combinaisons ne peuvent être amplifiées. Ce ne sont pas des configurations accessibles à l'enzyme ADN-polymérase, aucun des brins n'offre une matrice à copier à partir d'une extrémité 3'OH libre complémentaire sur l'autre brin.

Un inconvénient majeur de la SOE réside dans l'utilisation de la PCR ; plus le fragment est long, plus les risques d'erreur et donc de mutations indésirables sont importants.

Dans le cadre du projet d'inversion des NBD, la méthode SOE a été utilisée pour construire la partie jonctionnelle entre les deux NBD. En effet la comparaison des séquences nucléotidiques n'a pas permis de trouver de sites de restriction communs aux deux NBD. Dans les trois premières PCR, le vecteur de clonage des deux isoformes (pGEMHE2-SUR2A) sert de matrice. Par la suite l'ADN hybride est cloné de manière classique, (digestion, ligation... voir exemple **Figure 27**) dans le vecteur adéquat, pour obtenir la protéine hybride souhaitée.



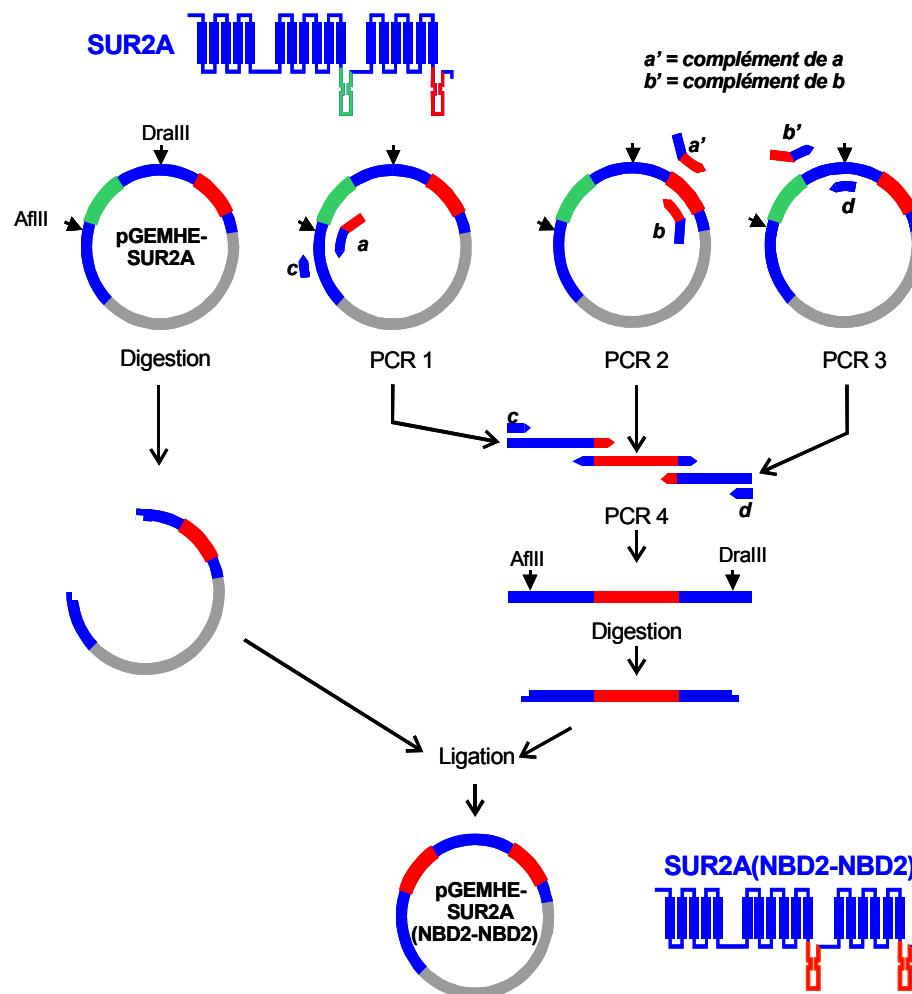
**Figure 27 : Stratégie de construction de la protéine hybride SUR2A NBD1-NBD1**

*Première étape : les trois fragments à raccorder sont amplifiés séparément*

avec des extrémités hybrides (PCR1, PCR2 et PCR3)

Deuxième étape : les trois fragments sont réunis et raccordés par une quatrième réaction de PCR (PCR4)

Troisième étape : la construction obtenue est digérée puis sous-clonée dans le vecteur SUR2A-pGH2 préalablement dépourvu de la portion correspondante par digestion avec les mêmes enzymes *DraIII* et *XhoI*



**Figure 28 : Stratégie de construction de la protéine hybride SUR2A NBD2-NBD2**

Première étape : les trois fragments à raccorder sont amplifiés séparément avec des extrémités hybrides (PCR1, PCR2 et PCR3)

Deuxième étape : les trois fragments sont réunis et raccordés par une quatrième réaction de PCR (PCR4)

Troisième étape : la construction obtenue est digérée puis sous-clonée dans le vecteur SUR2A-pGH2 préalablement dépourvu de la portion correspondante par digestion avec les mêmes enzymes *AflIII* et *DraIII*

### ***1.2.1.1 Assemblage des chimères : exemple des constructions SUR2A 1-1 et SUR2A 2-2***

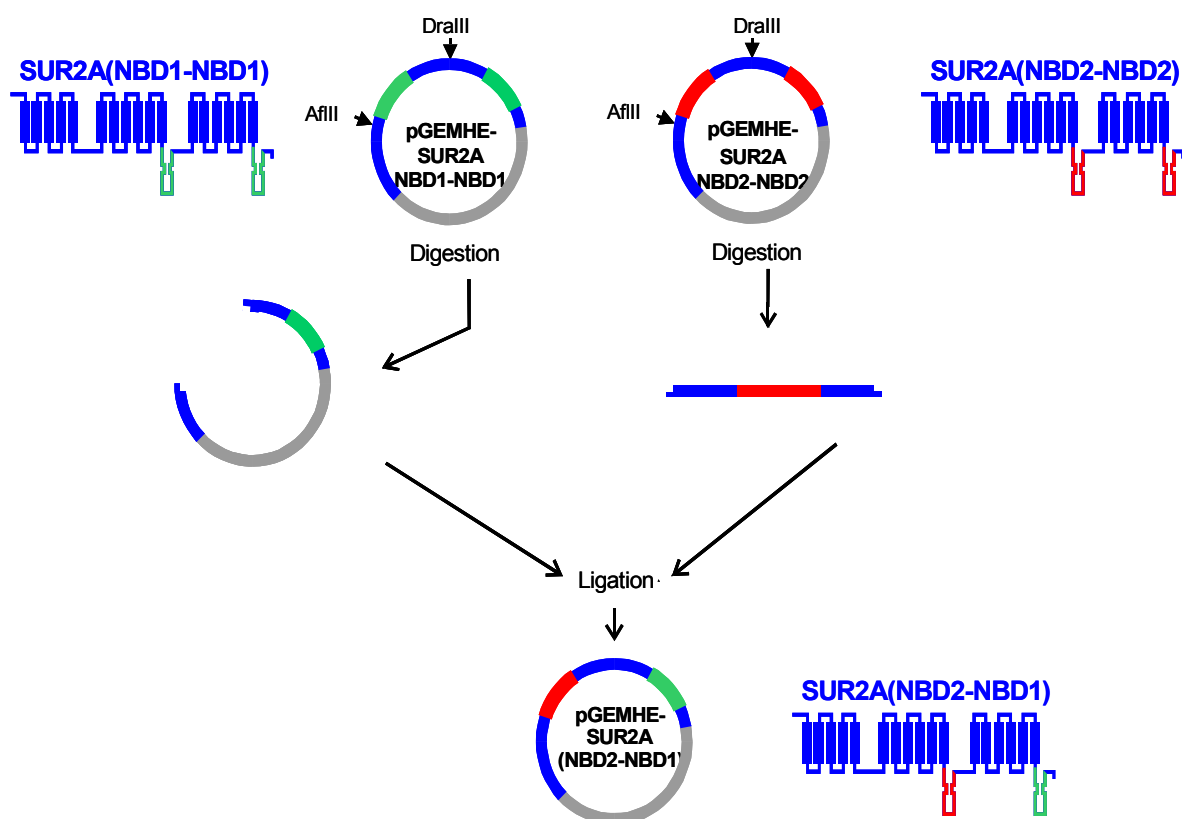
Après avoir effectué la SOE formant le fragment de jonction chimérique, diverses digestions sont réalisées sur 10 µg d'ADN plasmidiques et sur la totalité du fragment SOE (enzymes de restriction, Biolabs). Après digestion, les ADN, correspondant aux vecteurs ouverts et aux fragments à lier, sont déposés sur un gel d'agarose pur à 0,8% en vue de leur purification. Cette purification se réalise par adsorption d'ADN sur des billes (QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN). Le fragment pur est ensuite lié au vecteur ouvert (Rapid Ligation Kit, Boehringer). Il faut veiller à garder le bon cadre de lecture. *Escherichia coli*, rendue compétente par CaCl<sub>2</sub>, est transformée, à la suite d'un choc thermique, avec les différentes constructions. Les colonies sont sélectionnées grâce au gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide est extrait par une midipréparation (Plasmid Midi Kit, QIAGEN). L'exactitude du clone chimérique est vérifiée par séquençage.

*Remarque : Toutes ces étapes sont développées plus loin puisqu'elles sont également valables pour la construction de protéines mutées.*

Les **Figure 27** et **Figure 28** illustrent les stratégies de construction de ces protéines chimères.

### ***1.2.1.2 Cas particulier de la construction SUR2A 2-1***

Cette construction est obtenue par simple sous-clonage du NBD1C-ter de la construction SUR2A 1-1 dans le vecteur SUR2A 2-2 dépourvu de son second NBD2 (**Figure 29**).



**Figure 29 : Stratégie de construction de la protéine hybride SUR2A NBD2-NBD1**

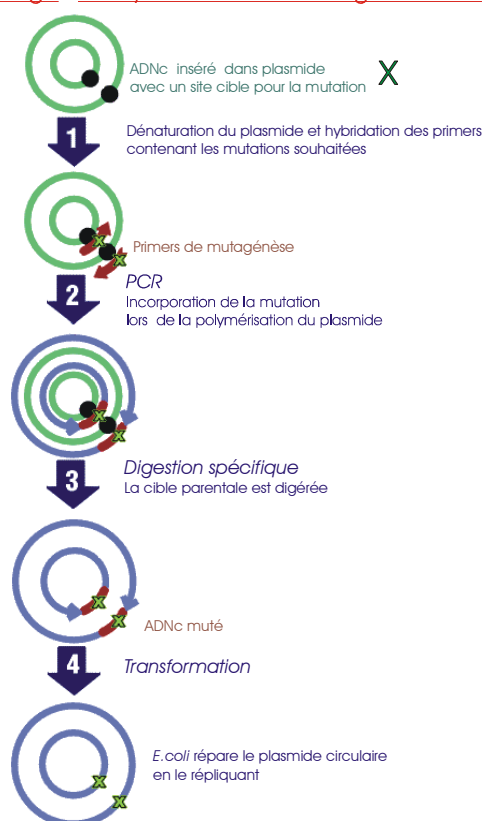
Le premier NBD1 de la construction SUR2A 1-1 est substitué par le premier NBD2 de la construction SUR2A 2-2 par simple sous-clonage après digestion des deux vecteurs par les enzymes de restriction AflIII et DraIII

### 1.2.2 Mutagenèse dirigée

La méthode de mutagenèse dirigée QuickChange (**Figure 30**) permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant la nature d'un acide aminé, d'insérer ou de déléter un ou plusieurs acides aminés. Au laboratoire nous utilisons le kit QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Cette méthode utilise les performances de la PfuTurbo DNA Polymerase qui réplique les deux brins d'un ADN plasmidique avec une haute fidélité à partir de deux oligonucléotides synthétiques contenant chacun la mutation désirée. Ces 2 oligonucléotides sont complémentaires entre eux et s'hybrident sur chacun des brins du plasmide. Ils sont allongés par la PfuTurbo DNA Polymerase et génèrent un plasmide muté. Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui reconnaît spécifiquement l'ADN méthylé ou hémiméthylé. L'ADN parental, non porteur de la mutation, est ainsi éliminé sélectivement. A l'issue de cette digestion, l'ADN

plasmidique néosynthétisé est introduit par transformation chez la bactérie *E. coli* qui répliquera le plasmide mutant.

#### QuickChange™ 1-Day Site-Directed Mutagenesis Method



*Figure 30 : Principe de la méthode de mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange de chez Statagene*

## 1.3 Amplification du matériel génétique

### 1.3.1 Transformation de bactéries compétentes

Des bactéries traitées avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  froid puis soumises à un bref choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  sont dans un état de compétence transitoire qui leur permet « d'ingérer » de l'ADN étranger (phage, plasmide...). Les bactéries dites « ultra-compétentes », utilisées ici, sont fournies avec le kit de mutagenèse dirigée QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis (Statagene).

Le transfert d'ADN est réalisé lors du choc thermique de 45 secondes à  $42^\circ\text{C}$ . Les bactéries recombinantes sont sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline (Le plasmide portant le gène de résistance à l'ampicilline, seules les bactéries porteuses de ce plasmide pourront se développer en présence de cet antibiotique).

### 1.3.2 Amplification et purification de l'ADN plasmidique

La Miniprep et la Midiprep sont des techniques qui permettent d'extraire l'ADN plasmidique par lyse alcaline à l'aide du kit de Qiagen. Le principe repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique superenroulé. Lorsque de la soude est ajoutée au lysat cellulaire, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. L'addition d'acide et de sel permet la réassociation en réseau insoluble de l'ADN chromosomique, alors que l'ADN plasmidique reprend sa forme native soluble. Une centrifugation permet l'élimination d'une grande partie des protéines, de l'ARN et de l'ADN chromosomique.

Dans le cas de la Miniprep, la culture bactérienne se fait dans 5 ml de milieu LB (Luria-Bertani) supplémenté en ampicilline (à raison de 100µg/ml). Il s'agit d'une étape préalable pour sélectionner un clone porteur de l'ADN recombinant.

Dans le cas de la Midiprep, le principe reste le même, seule la quantité de plasmide et sa pureté sont plus importantes puisque la culture bactérienne se fait dans 100 ml de LB et que la préparation est filtrée avant de passer sur une colonne d'affinité. Toutes les solutions nécessaires à l'extraction sont également fournies par le kit Qiagen Plasmid Purification.

L'isopropanol permet la précipitation de l'ADN qui est ensuite lavé dans l'éthanol 70 % puis repris dans de l'eau. La construction est vérifiée par digestion enzymatique dans un premier temps, puis par séquençage. La concentration d'ADN est estimée par lecture de densité optique au spectrophotomètre à 260 nm. Le rapport  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  doit être supérieur à 1,6 en l'absence de contaminations protéiques.

## 1.4 Séquençage

La technique de séquençage utilisée est adaptée de celle décrite par Sanger *et al.* (1977). La réaction de séquençage est effectuée par l'entreprise Genome Express de Grenoble sur séquenceur automatique. Quatre réactions de PCR sont menées parallèlement en présence d'une des quatre bases marquées par un fluorochrome spécifique sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate en très faible concentration et d'un seul « primer » qui va déterminer le sens du séquençage.

La migration sur gel des produits de séquence fluorescents permet la séparation de deux intermédiaires consécutifs ayant une taille qui diffère d'un seul nucléotide. Un système



optique, couplé à un logiciel d'analyse, détecte le fluorophore présent à l'extrémité du fragment. La succession ordonnée de ces fluorophores décrypte la séquence nucléotidique.

## 1.5 Transcription in vitro

Au cours de cette étape, tout le matériel et les réactifs sont « RNase free » et les manipulations sont réalisées sous hotte aspirante. Ainsi, l'eau est traitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate) qui inactive les RNAses en agissant sur les histidines. L'eau est incubée une nuit à température ambiante en présence de 0,05% de DEPC puis est autoclavée afin de dégrader le DEPC.

Les mutants sont transcrits en ARNm directement injectables dans les ovocytes (**Figure 31**). La transcription est réalisée par l'ARN Polymérase T7 (qui cible le promoteur T7 présent sur le vecteur pGEMHE). Le vecteur cible est au préalable linéarisé, en aval de la séquence 3'ut par coupure enzymatique (car il n'existe aucun signal d'arrêt de polymérisation), et purifié (extraction au phénol/chloroforme/isoamyl-alcool, précipitation à l'éthanol, le tout « RNase free ») pour éliminer tout résidu susceptible d'inhiber la transcription.

Le kit mMessage mMachine d'Ambion permet la synthèse de grandes quantités d'ARNm « coiffé » en 5' d'une guanosine méthylée permettant de débiter la traduction et de protéger l'ARN vis-à-vis de RNAses 5'→3'.

A la suite de la transcription (cf protocole [www.ambion.com](http://www.ambion.com)), les ARNm sont purifiés par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol. La quantité d'ARNm est estimée par comparaison avec un marqueur de concentration connue sur gel d'agarose dénaturant (enrichi en formaldéhyde).

Ils sont dilués (0,12 µg/µl pour Kir6.2 et 0,36 µg/µl pour SUR2A) et conservés sous forme d'aliquotes à -80°C pour limiter toute dégradation.

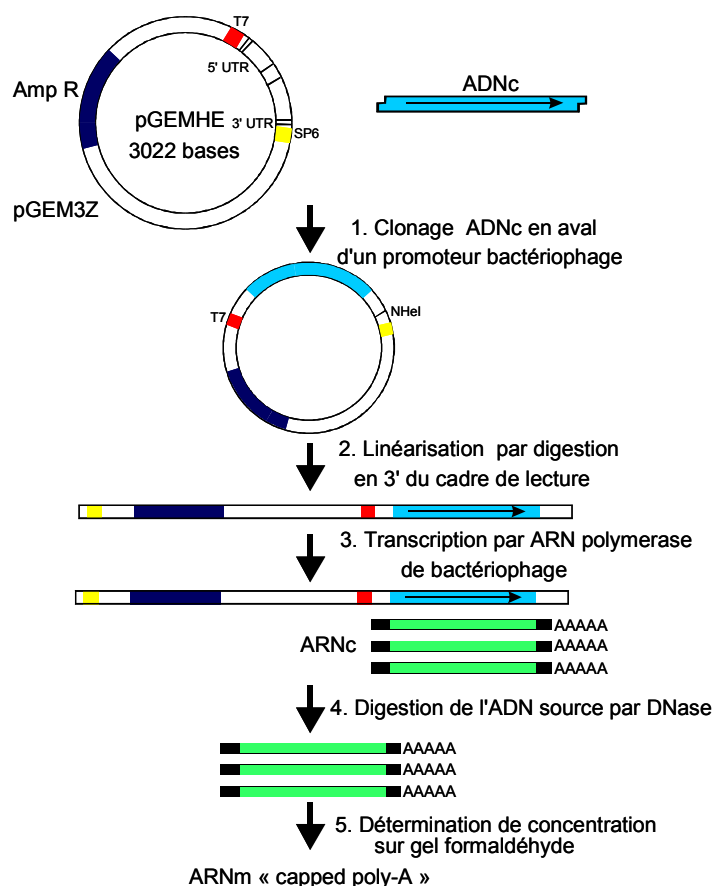


Figure 31 : Description des différentes étapes de la transcription *in vitro*

## 2 Expression hétérologue des canaux $K_{ATP}$

### 2.1 Préparation des ovocytes

L'ovocyte de Xénope, cellule sphérique d'un millimètre de diamètre, suffisamment grosse pour être manipulée et microinjectée sans appareillage sophistiqué, est un bon outil pour étudier les canaux ioniques. Le cytoplasme est rempli de réserves accumulées au cours de l'ovogenèse (enzymes, ribosomes, ARNt, protéines indispensables aux étapes traductionnelles et post-traductionnelles), qui permettent la traduction protéique d'ARNm exogènes.

Les Xénopes () utilisées au laboratoire proviennent du centre de recherche de biochimie macromoléculaire de Montpellier (CNRS). Leurs conditions d'élevage sont simples : regroupées (5 à 8) dans un aquarium où la température de l'eau (filtrée en permanence) est maintenue entre 16 et 18 °C dans une pièce isolée ayant un cycle 12h éclairée (jour) / 12h sombre (nuit).



**Figure 32 : Photographie d'une Xénope et de ses ovocytes.**

Les ovocytes (**Figure 32**) sont, chaque semaine, prélevés sur une Xénope anesthésiée par 1 g/l de 3-aminobenzoïc acid ethyl ester (Sigma). L'opération a lieu sur la glace pour maintenir l'animal endormi. Une incision abdominale, d'abord de la peau puis du muscle, permet d'accéder aux lobes ovariens qui sont prélevés à l'aide de pinces, à raison de 4 ou 5 lobes suivant les besoins. L'incision est suturée (fil de suture résorbable 5-0, pointe 16 mm 3/8c, 45cm, Ethicon VICRYL™) et la Xénope placée sur une pierre dans un bac contenant de l'eau pour éviter toute noyade avant son réveil.

Un traitement à la collagénase 20 mg/ml, 3 fois 40 minutes (collagénase IA, Sigma) permet de digérer le tissu conjonctif et de séparer chaque ovocyte de son enveloppe de cellules folliculaires. Les ovocytes sont ensuite lavés : 10 rinçages successifs dans une solution ionique dépourvue de calcium (solution A : **Tableau 5**), triés et conservés dans une solution isotonique (A+B) supplémentée en antibiotiques (**Tableau 7**).

NaCl	88
	mM
KCl	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,4
	mM
Hepes	16
	mM
MgSO <sub>4</sub>	0,82
	mM
pH ajusté à 7,4 par KOH	

Tableau 5 : Solution A

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,3 mM
$\text{CaCl}_2$	0,41 mM

Tableau 6 : Solution B

Pénicilline	1000 U/ml
Streptomycine	10 mg/ml
Gentamycine	0,1 mg/ml
Solution A+B	qsp 100 ml

Tableau 7 : Solution A+B+antibiotiques

## 2.2 Injection de l'ARNm

Les ovocytes sont immobilisés sur une grille dans une boîte de pétri contenant la solution A+B+antibiotiques. Les micropipettes (3.5'' Drummond # 3-000-203-G/X) sont étirées (Etireuse horizontale Micropipette Puller P-97, Sutter instruments Co) puis taillées (par cassure nette à l'aide d'un filament) avant d'être remplie d'huile minérale incompressible (Sigma) ce qui évite tout contact avec l'air. Le mélange des ARNm codant les deux sous-unités du canal : ARNm d'une isoforme de SUR ou d'un mutant, et ARNm de Kir6.2, dans des proportions respectant la stœchiométrie des 2 sous-unités (2 ng de Kir6.2 et 6 ng de SUR) est aspirée dans la micropipette. Celle-ci est alors positionnée au-dessus d'un ovocyte pour injecter le mélange d'ARN, à raison de 50 nl par ovocyte, à l'aide d'un injecteur (Nanoject, Drummond).

Les ovocytes sont conservés individuellement (microplaques de 96 puits) de 2 à 10 jours à 19°C en présence d'antibiotiques, afin de permettre une bonne expression protéique et l'adressage des sous-unités qui s'assemblent dans la membrane externe où les canaux vont être caractérisés.

### 3 Caractérisation des protéines membranaires

#### 3.1 Contrôle de la production de protéines

##### 3.1.1 Préparation des membranes

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C dans une solution tamponnée à pH 8 afin d'éviter toute dégradation enzymatique au cours de la préparation. Huit ovocytes sont broyés par 5 passages successifs dans une aiguille de 18 g, puis par 1 à 2 passages dans une aiguille de 27 g dans 900 µl de tampon de solubilisation (50 mM phosphate de sodium, 150 mM NaCl, pH 8 (d'après Tucker *et al.*, JBC 1996), 0,1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) supplémenté en inhibiteurs de protéases (1 tablette pour 50 ml, Roche). Les lysats sont centrifugés 3 à 4 fois à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les membranes totales est précipité à 165000 g (65000 tours / min) pendant 30 minutes. Le culot est repris par 15 µl de solution RIPA (pour 500 ml : 200 ml d'eau, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % sodium deoxycholate, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, pH 8) contenant des inhibiteurs de protéases (pour 5 ml de RIPA : 10 µl de DMSO, 10 µg de leupeptine, 10 µg de pepstatine, 10 mg de iodoacétamide, 50 µl de PMSF).

##### 3.1.2 Western-blot

Les préparations membranaires sont solubilisées dans un tampon de charge dénaturant à raison d'un volume de protéine pour un volume de tampon (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, SDS 4 %, 2-βmercapto-éthanol 10 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0,02 %). Elles sont ensuite chargées dans les puits d'un gel de concentration à 5 % de Bis acrylamide avant de passer dans un gel de migration à 10 % de Bis acrylamide (**Tableau 8**). Chargées négativement par le SDS, les protéines migrent suivant leur poids moléculaire apparent, sous l'influence d'un courant de 50 mA/gel.

	Gel de concentration (5 %) Volumes des composants (ml) pour 5 ml de gel	Gel de migration (10 %) Volumes des composants (ml) pour 20 ml de gel
Eau bidistillée	2,84	8,0
Bis acrylamide 30 %	0,83	6,7
Tris 1.5 M (pH 8.8)		5,0

Tris 0.5 M (pH 6.8)	1,25	
SDS 20 %	0,025	0,100
Persulfate d'ammonium 10 %	0,050	0,200
TEMED	0,005	0,008

**Tableau 8 :** Composition des gels de migration et de concentration

L'électrophorèse s'effectue dans du tampon de migration (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1 % SDS) pendant 1h environ. Le dépôt de protéines standard précolorées, de poids moléculaire connu, est effectué en parallèle.

Les protéines sont ensuite transférées sur des membranes de nitrocellulose (papier Hybond ECL d'Amersham) à 100 mA toute la nuit en chambre froide.

La membrane est rincée rapidement dans du TBS 1X (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4). Afin d'éviter la fixation non spécifique des anticorps utilisés ultérieurement, la membrane est incubée 1h dans une solution de blocage (TBS 1X, Blocking reagent 1 %). L'incubation avec l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de rat 3F10 anti-HA), à raison de 100 ng/ml pendant 1h30 à température ambiante, est suivie d'un rinçage rapide dans du TBS 1X et de 2 lavages de 10 et 30 minutes dans du tampon de lavage (TBS 1X, Blocking reagent 1 %, Tween 0,1 %). De même l'incubation avec l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-rat conjuguée à la HRP) dilué au 1/20000 pendant 1h30 à température ambiante est suivie d'un rinçage rapide dans du TBS 1X puis de 4 lavages de 10 minutes chacun (les 2 premiers dans du tampon de lavage, les 2 suivants dans du tampon de lavage dépourvu de blocking reagent). La révélation est effectuée par la technique ECL (Enhanced Chemiluminescence) d'Amersham : en présence des réactifs ECL, la peroxydase catalyse la libération de lumière qui permet l'impression d'un film d'autoradiographie (Hyperfilm ECL, Amersham).

### 3.2 Contrôle de l'adressage des protéines à la membrane plasmique

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C sur la glace. Les ovocytes exprimant la protéine d'intérêt marquée par un motif HA sont bloqués dans du ND96 supplémenté avec 1% de

BSA (Bovine Serum Albumine) pendant 30 minutes. Ils sont ensuite incubés 30 à 60 minutes dans 0,4 ng/μl d'anticorps primaire (anticorps monoclonal de rat 3F10 anti-HA), lavés 4 fois par du ND96-1% BSA, incubés 30 à 40 minutes dans 1 ng/μl d'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-rat conjuguée à la HRP), lavés 6 fois par du ND96-1% BSA puis 6 fois par du ND96. Chaque ovocyte est placé dans 50 μl de solution SuperSignal ELISA Femto Sensitivity Substrate (Pierce) et la lumière est comptée après 15 à 60 secondes d'incubation. L'émission de lumière est mesurée pendant 10 secondes par un luminomètre monotube Sirius Berthold.

### **3.3 Contrôle de la fonctionnalité des protéines**

#### **3.3.1 Le patch-clamp**

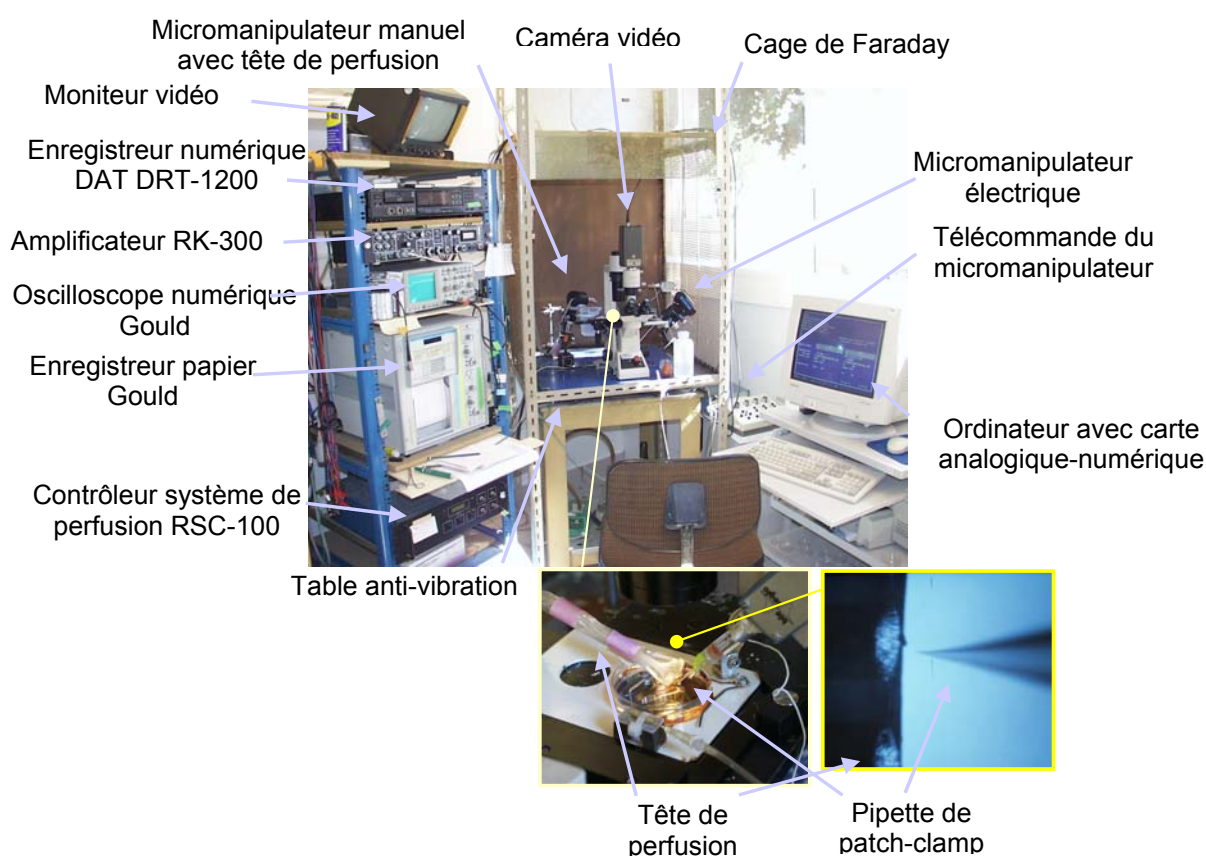
##### **3.3.1.1 Principe du patch-clamp**

Le passage d'ions à travers les membranes biologiques s'effectue au niveau de pores protéiques transmembranaires : les canaux ioniques. Bien que plusieurs états conformationnels soient possibles pour un même canal (verrouillé ouvert, verrouillé fermé...), on considère en général schématiquement les états "ouvert" et "fermé". Ces changements conformationnels se traduisent par l'ouverture ou la fermeture des voies de passage des ions. Le sens et l'intensité de ces mouvements ioniques dépendent, pour chaque espèce ionique, des forces de perméation liées à la force de diffusion qui tend vers l'équilibre des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane, et à la force électromotrice, dépendant de la valeur du potentiel de membrane. La technique du patch-clamp permet la mesure et l'étude des variations de courant induites par les mouvements ioniques, ainsi que l'étude du mode de régulation des canaux.

##### **3.3.1.2 Instrumentation et poste de Patch-clamp**

Un poste de patch-clamp (**Figure 33**) se compose d'un microscope, placé dans une cage de Faraday, muni d'un micromanipulateur 3 axes au bout duquel, une micro-pipette effilée en verre, remplie d'une solution électrolytique dans laquelle plonge une électrode d'argent, est mise en contact avec une cellule adhérente sur boîte de Pétri (en l'occurrence un ovocyte de Xenope) et baignant dans une solution physiologique. Lorsque la pipette est posée sur la membrane, il se forme un scellement (seal) étanche entre la pipette et la membrane.

Ce seal, formé entre la membrane et la pipette, ne permet aucun échange ionique entre la solution contenue dans la pipette et la solution bain (résistance de l'ordre du giga-Ohm), ce qui permet d'isoler mécaniquement et électriquement une petite portion de la membrane (patch). Un système électronique de stimulation et d'amplification, relié à l'électrode d'argent plongeant dans la micro-pipette, permet alors de mesurer les courants (de l'ordre du pico-ampère) induits par le passage des ions au travers des canaux isolés, mais également d'imposer et de maintenir un potentiel (clamp) sur la portion de membrane isolée.



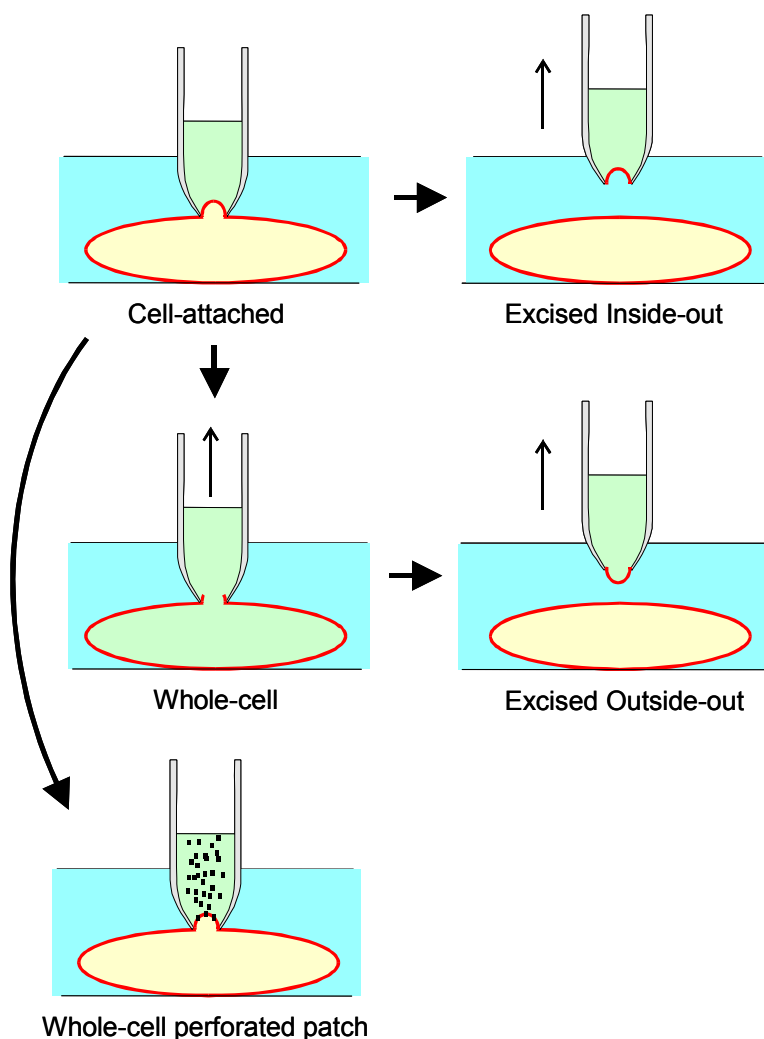
**Figure 33 : Installation du poste de patch-clamp**

### 3.3.1.3 Les différentes configurations de patch-clamp

L'application de cette technique peut se faire selon diverses configurations (**Figure 34**). Dans la configuration dite *cell attached*, la pipette de patch demeure sur la surface externe de la cellule entière. Cette approche est particulièrement utile pour l'étude des processus d'activation de canaux ioniques via des messagers intracellulaires tels que le calcium. A partir de la configuration *cell attached*, il est aussi possible de détruire, soit par succion, soit en appliquant un voltage élevé, la membrane sous la pipette de patch tout en



conservant le contact entre la membrane et le verre. Dans ces conditions, la solution de remplissage de la pipette communique avec le milieu cytoplasmique et la pipette de patch peut être utilisée pour les expériences de voltage imposé sur toute la cellule. Cette variante dite *whole cell* permet aussi d'injecter dans la cellule certaines substances telles que des enzymes et des nucléotides dont l'action est susceptible de moduler l'activité électrique des canaux ioniques. A partir de cette configuration, on peut retirer la pipette de la cellule et obtenir ainsi, dans certaines conditions, un morceau isolé de membrane dont la surface externe est exposée vers l'extérieur. Cette variante dite *outside-out* est de préférence employée lors d'expériences où l'environnement de la surface externe nécessite d'être modifié. Enfin, si on soulève la pipette de patch à partir de la configuration *cell attached*, il est possible d'obtenir un infime morceau de membrane isolée dont la surface cytoplasmique est alors mise en contact avec les divers milieux ioniques du bain. Une telle configuration appelée *inside-out* s'est avérée particulièrement fructueuse lors de l'étude de canaux ioniques activés par certains agents chimiques intracellulaires. Notons enfin que des conditions expérimentales, équivalentes à la configuration *inside-out*, ont été aussi obtenues en perméabilisant la cellule à l'aide de détergents afin d'obtenir la configuration *open cell attached*.



**Figure 34 : Les différentes configurations de patch-clamp**

La configuration « cell-attached » permet de préserver l'intégrité du cytoplasme. La configuration « whole-cell » permet la mesure de la totalité des courants de la cellule. Les configurations excisées « inside-out » ou « outside-out » permettent d'accéder à des sites de régulation respectivement intracellulaires ou extracellulaires.

### 3.3.1.4 Les conditions expérimentales

#### 3.3.1.4.1 Préparation de l'ovocyte

Après 2 à 3 jours d'incubation des ovocytes à 19°C, temps requis pour une bonne expression des protéines, la membrane vitelline est retirée mécaniquement à l'aide de pinces et l'œuf placé au sein du poste de patch. Dépourvu de sa membrane vitelline, l'ovocyte est très fragile : un simple contact avec l'air lui est fatal et sa « durée de vie » se limite à 1 ou 2 heures. Cette opération n'est donc réalisée qu'individuellement avant les mesures, sous la loupe binoculaire, en plaçant l'œuf dans une solution hyperosmotique

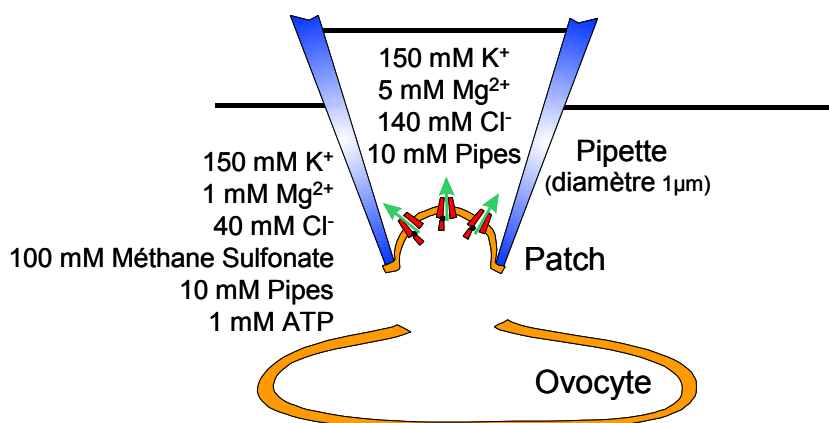
(solution A + 100 mM NaCl) pendant 5 minutes. L'œuf se rétracte, la membrane vitelline apparaît alors comme une enveloppe translucide autour de l'ovocyte. Il est alors plus aisé de la retirer à l'aide de deux pinces.

#### 3.3.1.4.2 Microélectrode de mesure

Les micropipettes mises en contact avec la membrane pour former un patch sont réalisées à partir de tubes capillaires de borosilicate (Kimax-51, Kimble products). Après chauffage, ces tubes sont étirés sous l'effet d'une tension contrôlée pour produire des micropipettes de diamètre de l'ordre du  $\mu\text{m}$ .

Cette micropipette est remplie à moitié d'une solution isotonique au milieu intracellulaire (**Figure 35**) et entoure un filament d'argent chloruré. La concentration potassique est comparable de part et d'autre de la membrane de patch afin que le potentiel d'équilibre du potassium ( $E_K$ ) soit pratiquement nul.

Ce filament d'argent recouvert de chlorure d'argent permet de convertir un courant d'ions en solution en un courant d'électrons : le chlorure d'argent participe à une réaction réversible avec les ions  $\text{Cl}^-$  en solution  $\text{Cl}^- + \text{Ag} \rightleftharpoons \text{AgCl} + \text{e}^-$



**Figure 35 :** Composition des solutions utilisées lors des mesures de courants potassiques pour minimiser la contribution d'autres canaux que les canaux KATP et pour que le potentiel d'équilibre du potassium ( $E_K$ ) soit nul.

#### 3.3.1.4.3 Formation du « seal » et mesures de courant

La micropipette est approchée lentement de l'ovocyte ; une fois le contact établi, une légère dépression, réalisée par de petites aspirations dans la pipette, facilite la formation du « seal ». Dès que la résistance est de l'ordre du gigaohm, la pipette est rapidement retirée de la membrane. L'extrémité de la micropipette, où se trouve le morceau de membrane, est alors placée devant un système de perfusion relié aux tubes contenant les solutions à tester,

riches en  $K^+$  et ne contenant aucun autre ion perméant (comme  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$ ), de manière à n'observer que des courants potassiques.

Le courant transmembranaire transporté par  $K^+$  ( $I_K$ ) à travers tous les canaux ioniques de la membrane est égal à :  $I_K = g_K \cdot (V_m - E_K)$ , transposition de la loi d'Ohm au gradient électrochimique ( $V_m - E_K$ ), avec  $V_m$ , potentiel de membrane d'une cellule au repos, imposé à  $V_m = -50mV$  et  $E_K$ , potentiel d'équilibre de  $K^+$  :  $E_K = 0$ .  $g_K$  est la conductance transmembranaire pour  $K^+$ , traduction de la facilité avec laquelle les ions  $K^+$  traversent les pores de la membrane.

Les solutions isotoniques contiennent les agents pharmacologiques à étudier, ainsi que différentes natures et concentrations de nucléotides.

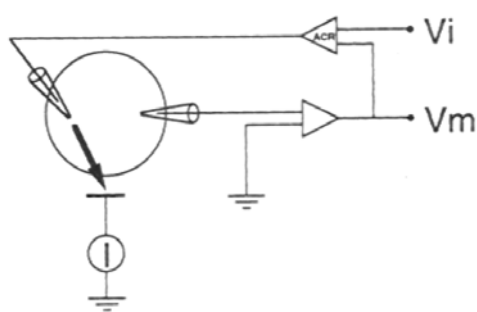
La présence des canaux est décelée par la mesure de courants lors de la perfusion d'une solution totalement dépourvue d'ATP. Dans nos conditions expérimentales, une déflexion vers le bas (courant « négatif ») traduit une ouverture du canal, et par conséquent une activation lors de l'application des ouvreurs pharmacologiques. Les courants mesurés sont quantifiés par rapport aux courants mesurés en absence d'ATP (courants normalisés). Un histogramme présente la moyenne et l'écart-type des courants obtenus avant et pendant l'application de chaque drogue.

### 3.3.2 Double électrode : TEVC (Two Electrode Voltage-Clamp)

#### 3.3.2.1 Principe

La taille trop importante de l'ovocyte de Xénope (1,2 à 1,3 mm de diamètre) ne permet pas l'étude des courants macroscopiques par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière, mais ces courants peuvent être enregistrés par la technique de double électrode ou TEVC à l'aide d'un amplificateur GeneClamp 500 (Axon Instruments).

L'œuf est alors empalé par deux microélectrodes. La première maintient le potentiel de membrane ( $V_m$ ) entre les faces interne et externe de la membrane à une valeur constante et choisie par l'expérimentateur ( $V_i$ ). Une deuxième électrode va permettre de mesurer l'intensité du courant obtenu en réponse (**Figure 36**). Le courant mesuré correspond à l'ensemble des canaux de la membrane plasmique.



**Figure 36 :** Le potentiel imposé ("Voltage Clamp") consiste à maintenir le potentiel de membrane ( $V_m$ ) à une valeur constante et imposée par l'expérimentateur ( $V_i$ ). Pour ce faire, un amplificateur à contre réaction (ACR) délivre un courant ( $I$ ) égal et de sens opposé au courant ionique transmembranaire et tendant à annuler la différence ( $V_i - V_m$ ). Les cellules de gros diamètre sont empalées par deux microélectrodes dont l'une impose le potentiel transmembranaire et l'autre mesure l'intensité du courant résultant

### 3.3.2.2 Conditions expérimentales

La cellule est placée dans une cuve de 200  $\mu\text{l}$  contenant une solution « extracellulaire » (KCl 90 mM, HEPES 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH ajusté à 7.4 par KOH) que l'on peut faire varier selon les conditions à tester grâce à un système de perfusion. Les microélectrodes sont réalisées en étirant des capillaires en borosilicate après chauffage sous l'effet d'une tension contrôlée (extrémités de l'ordre du micron, résistance de l'ordre de 0,5 Mégahom). Le tube de verre constituant l'électrode est rempli d'une solution ionique conductrice de KCl (3 M). Les électrodes sont plongées dans la partie large de la pipette. L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées à l'aide du logiciel pClamp (Axon Instruments). Le programme utilisé permet d'imposer des potentiels successivement de 0, -50, 0, +50, et 0 mV ; cette succession de potentiels constitue une période de 5 s.

Des activateurs ou inhibiteurs des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$  sont alors perfusés et les courants résultants enregistrés.

*Sélectivité aux ouvreurs  
pharmacologiques*



## 1 **Position du problème**

Les ouvreurs pharmacologiques peuvent être classés en deux catégories :

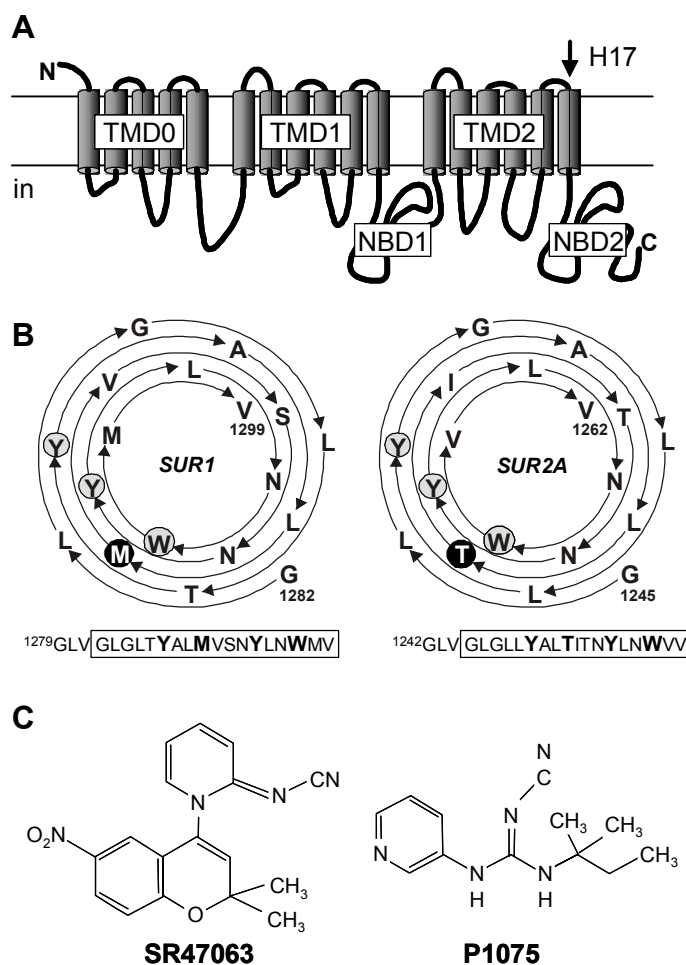
- le diazoxide,
- les autres ouvreurs, incluant le pinacidil, le cromakalim et le nicorandil.

En effet, le premier cible l'isoforme SUR1 du récepteur des sulfonylurées alors que les seconds agissent sur les isoformes SUR2A et SUR2B.

A l'aide d'une approche chimérique, de précédents travaux au sein de l'équipe ont permis de localiser le site de fixation des ouvreurs pharmacologiques autres que le diazoxide au niveau de la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire. Deux résidus, L1249 et T1253 chez SUR2A, sont nécessaires (lorsque ces résidus sont mutés chez SUR2A, les ouvreurs n'ont plus d'effet) et suffisants (l'introduction de ces résidus chez SUR1 confère une sensibilité) pour conférer une sensibilité à ces ouvreurs (Moreau *et al.*, 2000).

La poursuite de ce travail nous a conduit à nous interroger sur la nature de l'interaction entre l'acide aminé Thr1253 de SUR2A et l'ouvreur potassique ainsi que sur l'implication des résidus aromatiques avoisinant cette Thr1253 (**Figure 37**). Les bases moléculaires de cette interaction ont donc été examinées par mutagenèse dirigée des résidus clefs.





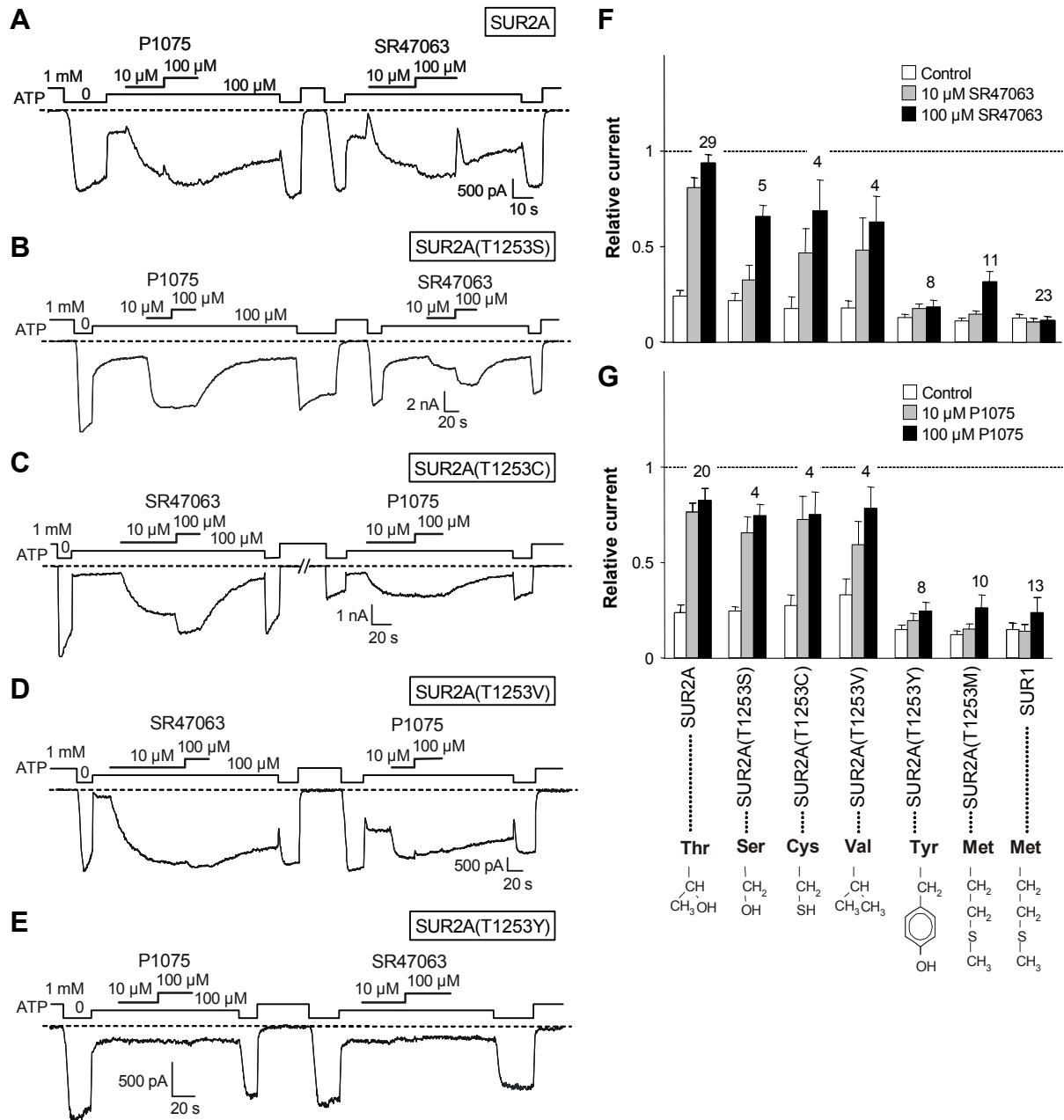
**Figure 37 :** **A.** Prédiction de la topologie de SUR présentant les 3 domaines transmembranaires (TMD) et les 2 domaines de liaison des nucléotides (NBD). La 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire est indiquée. **B.** Représentation hélicoïdale de la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire de SUR1 et de SUR2A vue du côté extracellulaire avec les résidus clef entourés. SUR1-M1290 et SUR2A-T1253 sont figurés en blanc sur fond noir alors que les résidus aromatiques voisins sont en noir sur fond gris (SUR1-Y1287, Y1294, W1297 et SUR2A-Y1250, Y1257, W1260). La séquence linéaire est présentée au-dessous. Les numéros se réfèrent aux protéines du rat pour SUR1 et du hamster pour SUR2A. **C.** Structure chimique des ouvreurs potassiques utilisés dans cette étude, le benzopyrane SR47063 et la guanidine P1075.

## 2 Résultats

### 2.1 La thréonine 1253 de SUR2A n'est pas impliquée dans une liaison hydrogène avec l'ouvreur potassique

Les résultats obtenus contredisent l'hypothèse selon laquelle la Thr1253 de SUR2A réaliserait une liaison hydrogène avec l'ouvreur potassique. En effet, la substitution de cette thréonine par d'autres acides aminés de taille (sérine et tyrosine) et de polarité (valine

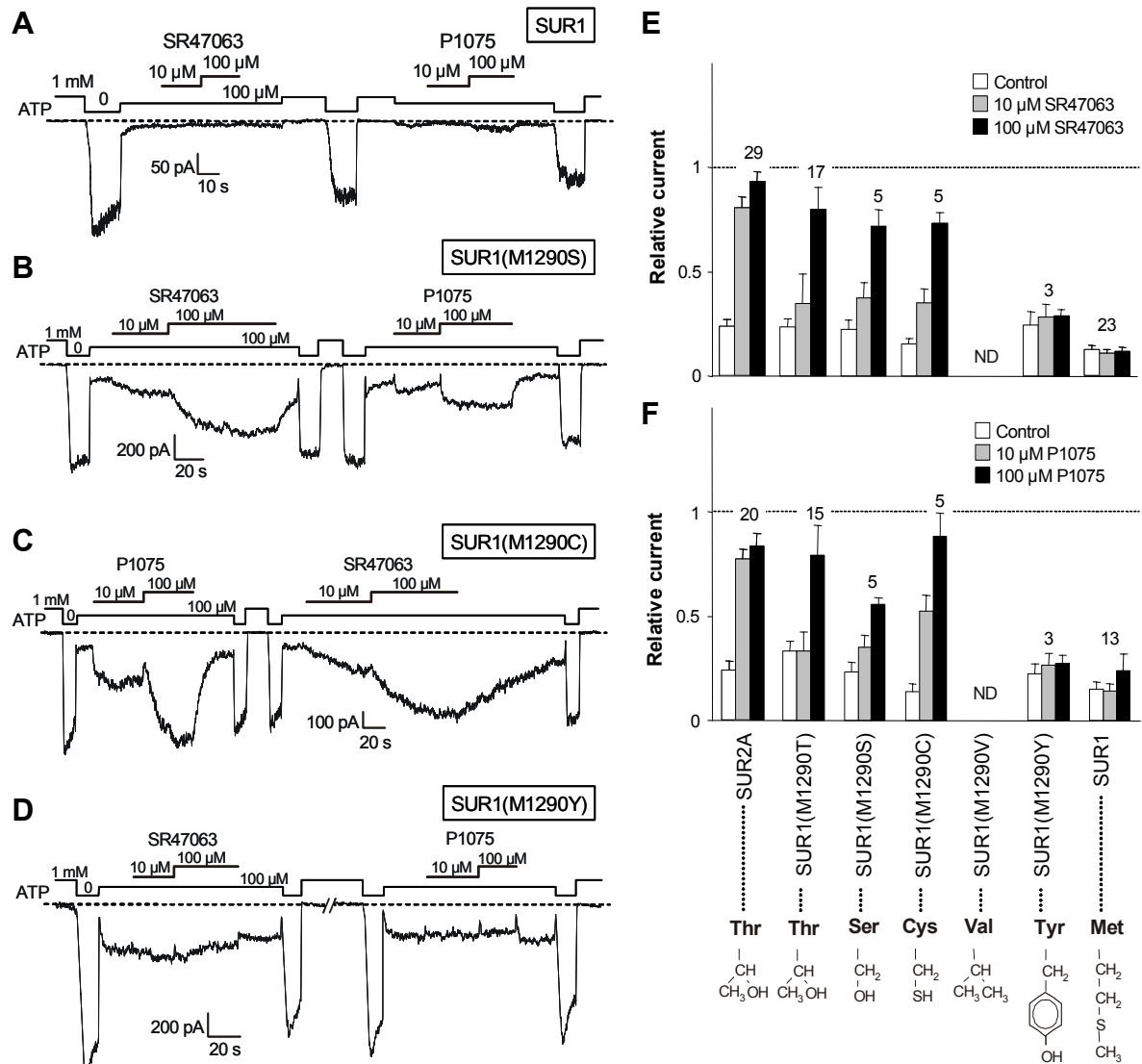
et cystéine) variables, ou les deux (méthionine) montre que seul l'encombrement stérique est important : seuls les mutants tyrosine et méthionine ont perdu leur sensibilité (**Figure 38**).



**Figure 38 :** Une réduction de l'activation par les ouvreurs potassiques est observable lorsque la taille de l'acide aminé en position 1253 de SUR2A augmente. Les réponses du type sauvage et des mutants SUR2A aux ouvreurs potassiques SR47063 et P1075 sont mesurées en enregistrant des courants à -50 mV à partir de patch excisés d'ovocyte de Xénope en configuration inside-out exprimant Kir6.2 et la sous-unité SUR indiquée. **A-E** Exemples d'enregistrements pour la sous-unité SUR indiquée. **F-G** Courants moyens relatifs mesurés avant et pendant l'application de l'ouvreur

spécifié. Les courants sont moyennés après avoir été normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP pour chaque patch. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte.

Inversement, ces mêmes mutations effectuées sur la Met1290 de SUR1 rendent la protéine sensible au P1075 et au SR47063, excepté pour la substitution en tyrosine (**Figure 39**). Ainsi il apparaît que la taille de la chaîne latérale de l'acide aminé est impliquée dans la sensibilité aux ouvreurs indépendamment de sa polarité.

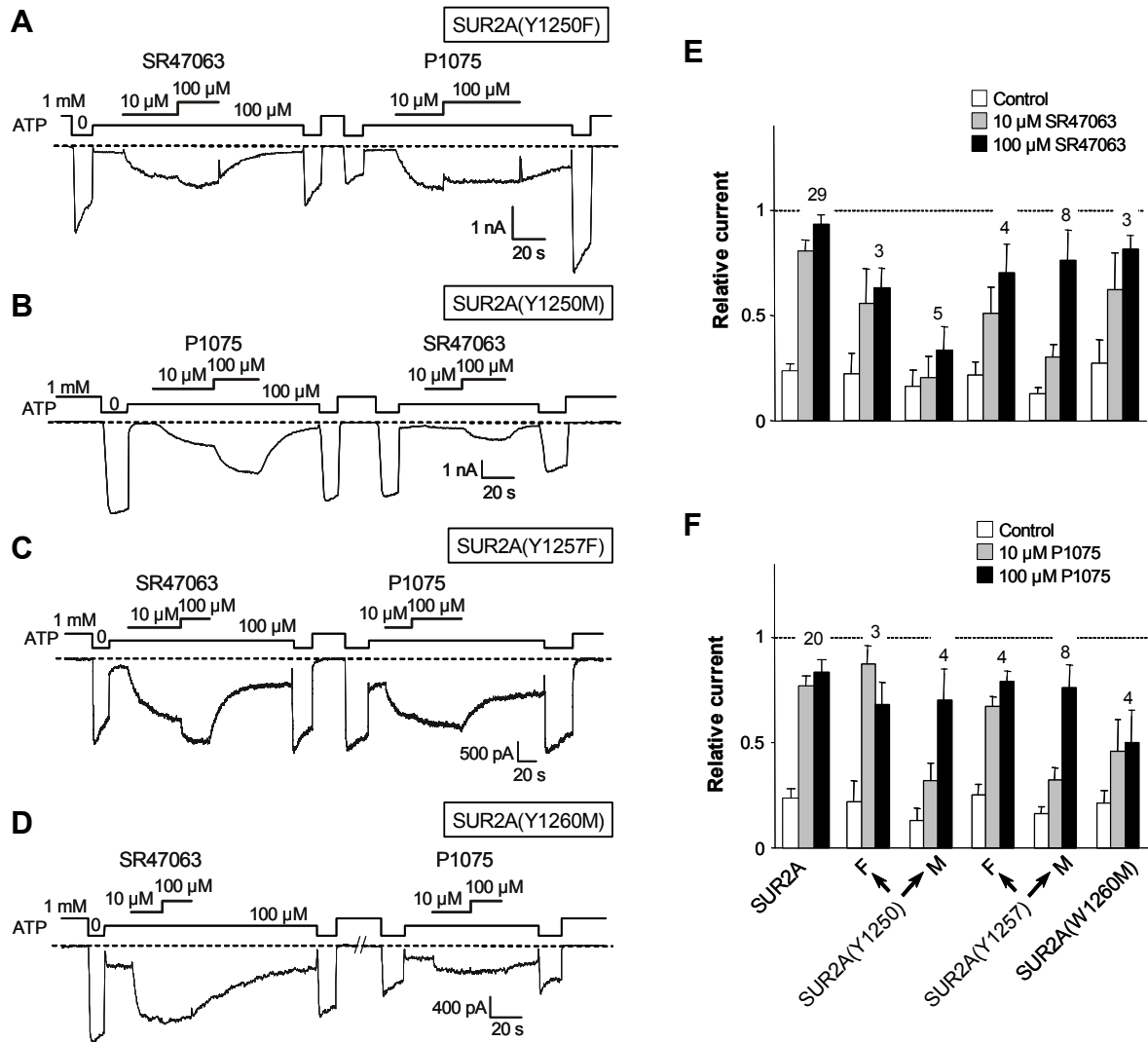


**Figure 39 :** Une augmentation de l'activation par les ouvreurs potassiques est observable lorsque la taille de l'acide aminé en position 1290 de SUR1 diminue. Les réponses du type sauvage et des mutants SUR1 aux ouvreurs potassiques SR47063 et P1075 sont mesurées en enregistrant des

*courants à -50 mV à partir de patch excisés d'ovocyte de Xénope en configuration inside-out exprimant Kir6.2 et la sous-unité SUR indiquée. A-D Exemples d'enregistrements pour la sous-unité SUR indiquée. E-F Courants moyens relatifs mesurés avant et pendant l'application de l'ouvreur spécifié. Les courants sont moyennés après avoir été normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP pour chaque patch. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. Les réponses du mutant SUR1(M1290V) n'ont pas été déterminées (ND) à cause d'une expression trop faible.*

## **2.2 Rôle des résidus aromatiques de la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire dans l'activation par les ouvreurs potassiques**

Trois résidus aromatiques, Tyr1250, Tyr1257 et Trp1260, très proches de la Thr1253 de SUR2A (**Figure 37A**), seraient susceptibles d'interagir par des liaisons de « stacking » avec les ouvreurs potassiques qui possèdent tous un cycle aromatique. Ces résidus sont conservés chez les différentes isoformes de SUR et chez la plupart des transporteurs ABC de la famille ABBC/MRP. La substitution en méthionine de ces trois résidus, pour maintenir le caractère hydrophobe et l'encombrement stérique, et en phénylalanine pour les deux tyrosines, montre que les cycles aromatiques des deux tyrosines influencent l'affinité de la protéine à la fois au SR47063 et au P1075 alors que la mutation du Trp1260 réduit seulement l'activation par le P1075 (**Figure 40**).



**Figure 40 :** Effets de la mutation des résidus aromatiques de l'hélice 17 de SUR2A sur la sensibilité des canaux aux ouvreurs potassiques. Les réponses du type sauvage et des mutants SUR2A aux ouvreurs potassiques SR47063 et P1075 sont mesurées en enregistrant des courants à -50 mV à partir de patch excisés d'ovocyte de *Xénope* en configuration inside-out exprimant Kir6.2 et la sous-unité SUR indiquée. **A-D** Exemples d'enregistrements pour la sous-unité SUR indiquée. **E-F** Courants moyens relatifs mesurés avant et pendant l'application de l'ouvreur spécifié. Les courants sont moyennés après avoir été normalisés par rapport au courant mesuré en absence d'ATP pour chaque patch. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte.

### 3 *Discussion*

#### 3.1 **La taille de la chaîne latérale des résidus SUR2A-T1253 et SUR1-M1290 est un facteur critique pour l'effet des ouvreurs potassiques**

De précédents travaux au sein de l'équipe ont montré que la différence entre les phénotypes pharmaceutiques de SUR1 et de SUR2A pouvait être attribuée en grande partie à la présence de deux acides aminés à deux positions distinctes au niveau de la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire de SUR. Il s'agit des résidus T1286 et M1290 chez SUR1 et des résidus L1249 et T1253 chez SUR2A. La première position semble moins importante étant donné que la mutation T1286L ne confère qu'une faible sensibilité au SR47063 mais pas au P1075 ou au rilmakalim (Moreau *et al.*, 2000) ; nous nous sommes donc intéressé dans ce travail à la dernière position. Une thréonine à cette position, comme dans le type sauvage SUR2A, augmente considérablement la sensibilité aux ouvreurs, alors qu'une méthionine, comme dans le type sauvage SUR1, la diminue fortement. A quelles propriétés physicochimiques sont dus ces effets ? Pour tenter de répondre à cette question nous avons muté la thréonine 1253 de SUR2A et la méthionine 1290 de SUR1 en des résidus de taille et de polarité variables et enregistré les réponses de ces canaux mutants aux ouvreurs potassiques SR47063 et P1075. Les mutations ont été testées dans deux contextes différents : chez SUR1, où elles ne causent aucun changement ou un gain de fonction ; chez SUR2A, où elles ne causent aucun changement ou une perte de fonction. Les résultats obtenus pour SUR1 et SUR2A sont concordants et permettent de conclure que seule la taille du résidu est en cause. Ainsi, SUR1 devient activable lorsque le résidu en position 1290 est plus compact qu'une méthionine et SUR2A perd sa sensibilité à l'ouvreur lorsque le résidu en position 1253 est une méthionine ou un résidu encombrant. En somme, les résidus « autorisant » une sensibilité aux ouvreurs potassiques SR47063 et P1075 sont non seulement la thréonine, un résidu hydrophile capable de former des liaisons hydrogène, mais également la sérine qui possède les mêmes propriétés mais qui est plus petite, la cystéine qui a une taille comparable mais qui ne peut pas former de liaisons hydrogène et la valine qui a une taille comparable mais qui est hydrophobe et ne peut faire de liaison hydrogène. Les résidus « n'autorisant pas » la sensibilité aux ouvreurs pharmacologiques sont la grosse méthionine hydrophobe et la grosse tyrosine hydrophile.

On peut déduire de ces observations que la taille de la chaîne latérale est le seul déterminant de la sensibilité aux ouvreurs potassiques et contredit un contact étroit entre

l'ouvreur et la Thr1253 de SUR2A pendant la liaison. Elles suggèrent que ce résidu clef puisse agir comme une porte face au site de liaison, en accord avec les taux de dissociation plus rapides observés pour les plus petits résidus sérine et cystéine, mais pas pour le résidu valine de même taille.

### **3.2 L'action des ouvreurs potassiques est modulée par les résidus aromatiques de la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire**

SUR1-M1290 et SUR2A-T1253 sont des résidus critiques pour la spécificité de l'action des ouvreurs potassiques, cependant les résultats précédents indiquent clairement qu'ils ne participent pas à des interactions directes avec eux. Des études de liaisons et d'électrophysiologies (D'hahan *et al.*, 1999a ; Udhe *et al.*, 1999, Moreau *et al.*, 2000) laissent penser que le site de liaison des ouvreurs potassiques inclut la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire ainsi que d'autres régions telles que la boucle intracellulaire entre les hélices transmembranaires 13 et 14. En focalisant nos recherches sur la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire, nous nous sommes intéressé à trois résidus aromatiques prédits comme étant proches de la Thr1253 de SUR2A. Ces résidus, SUR2A-Y1250, -Y1257 et -W1260 sont conservés chez tous les isoformes SUR et sont également présents dans la plupart des transporteurs ABC de la sous-famille ABCC/MRP. Pour déterminer si ces résidus sont capables d'interagir par des liaisons de « stacking » avec les cycles aromatiques des ouvreurs potassiques, nous les avons substitués par une méthionine, un résidu hydrophobe non aromatique de taille semblable. Les effets de ces mutations ne sont pas aussi clairs que les résultats précédents. Tous les mutants présentent une sensibilité aux ouvreurs potassiques testés mais on observe une réduction de la sensibilité lorsque les tyrosines 1250 ou 1257 sont mutées en méthionine. Ceci n'est pas le cas lorsque les tyrosines sont mutées en phénylalanine ce qui suggère que le cycle aromatique de ces résidus est important. En ce qui concerne le tryptophane 1260, la mutation en méthionine n'affecte pas la sensibilité au SR47063, mais elle affecte celle du P1075. Au contraire la mutation SUR2A-Y1250M réduit beaucoup plus l'activation par le SR47063 que par le P1075.

On peut déduire de cette observation que les résidus aromatiques de l'hélice transmembranaire 17 interagissent avec les ouvreurs potassiques et que ces interactions dépendent de la structure de l'ouvreur potassique, comme si ces résidus prenaient part à une poche de liaison accessible à différents ouvreurs.

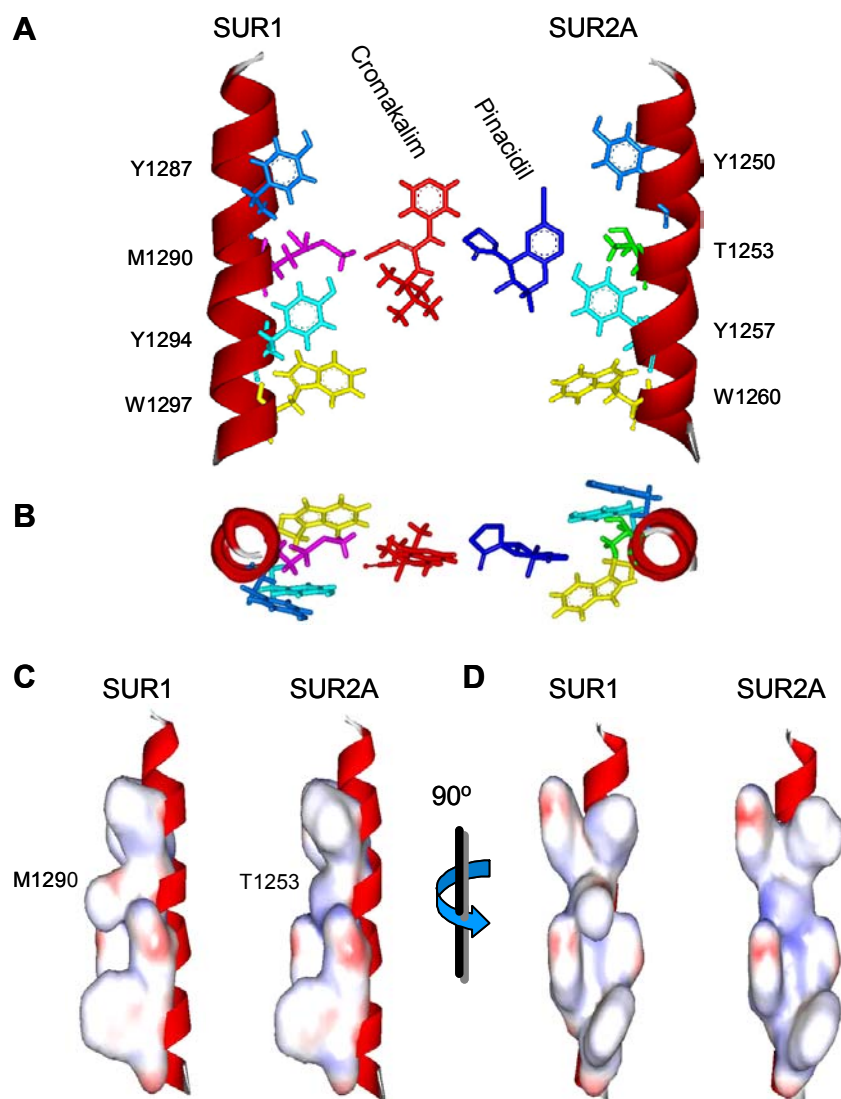
## 4 Conclusion

En résumé, l'hélice transmembranaire 17 joue un rôle fondamental dans le contrôle de l'activation du canal  $K_{ATP}$  par les ouvreurs potassiques. Un résidu, SUR1-M1290 ou SUR2A-T1253, agit comme un interrupteur oui/non alors que les résidus aromatiques voisins modulent l'activation par les ouvreurs potassiques SR47063 ou P1075.

Il semblerait que la chaîne latérale de la méthionine 1290 de SUR1 empêche l'accès au site de liaison des ouvreurs. Ce site pourrait être constitué pour partie de résidus aromatiques contribuant à des interactions  $\pi$ - $\pi$  dites de « stacking » suffisamment aspécifiques pour tolérer une large variété de substrats (Pawagi *et al.*, 1994). Une représentation tri-dimensionnelle de l'hélice 17 (**Figure 41**) révèle qu'une telle hypothèse est envisageable malgré les contraintes imposées par la structure primaire et la taille des chaînes latérales des résidus aussi bien que celle des ouvreurs.

Enfin, bien que nous ne disposions pas de structure cristalline de notre protéine pour connaître la véritable orientation des chaînes latérales de la méthionine 1290 de SUR1 et de la thréonine 1253 de SUR2A, un modèle de MRP1 (un transporteur ABC très homologue à SUR), basé sur les cristaux de transporteurs ABC bactériens MsbA, a été développé (Campbell *et al.*, 2004). Les auteurs montrent que la mutation de plusieurs résidus aromatiques prédits comme prenant part à la translocation du substrat détériore ce transport. Parmi ces résidus, MRP1-W1246 correspond à SUR1-W1297 et SUR2A-W1260. Etant donné que ces tryptophanes sont localisés du même côté de l'hélice 17 que SUR1-M1290 et SUR2A-T1253, on peut penser le rôle de cette méthionine est d'empêcher l'interaction entre les résidus aromatiques testés communs aux deux isoformes et les ouvreurs.





**Figure 41** : Modèle hypothétique des interactions moléculaires entre l'hélice 17 et les ouvreurs potassiques. **A.** Vue de profil de la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire de SUR1 et de SUR2A avec une représentation en « stick » des résidus saillants et des ouvreurs cromakalim (en bleu) et pinacidil (en rouge) à partir desquels le SR47063 et le P1075 sont dérivés. **B.** Même représentation vue de haut. **C-D** Représentations de la surface moléculaire de l'hélice transmembranaire 17 de SUR1 et de SUR2A. Les résidus clés M1290 et T1253 sont marqués. Les couleurs reflètent le potentiel électrostatique.

*Modulation des canaux  $K_{ATP}$  par  
les métaux lourds*





## 1.1 Quelques mots sur la physiologie du zinc

Le zinc est un élément essentiel présent dans la plupart des tissus et impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires : croissance, développement, différenciation cellulaire, régulation génique, régulation immunitaire, contrôle de l'activité de nombreux récepteurs et enzymes... Son homéostasie et son transport sont donc finement régulés (Sève *et al.*, 1997)

Plus de 300 enzymes, de 50 types différents, nécessitent le zinc pour fonctionner (oxydoréductases, endopeptidases, hydrolases, ligases, isomérases, etc...)

Le zinc peut avoir diverses fonctions :

- zinc catalytique ou co-catalytique (zinc cluster)
- zinc structural (zinc cluster, zinc finger ou zinc twist)

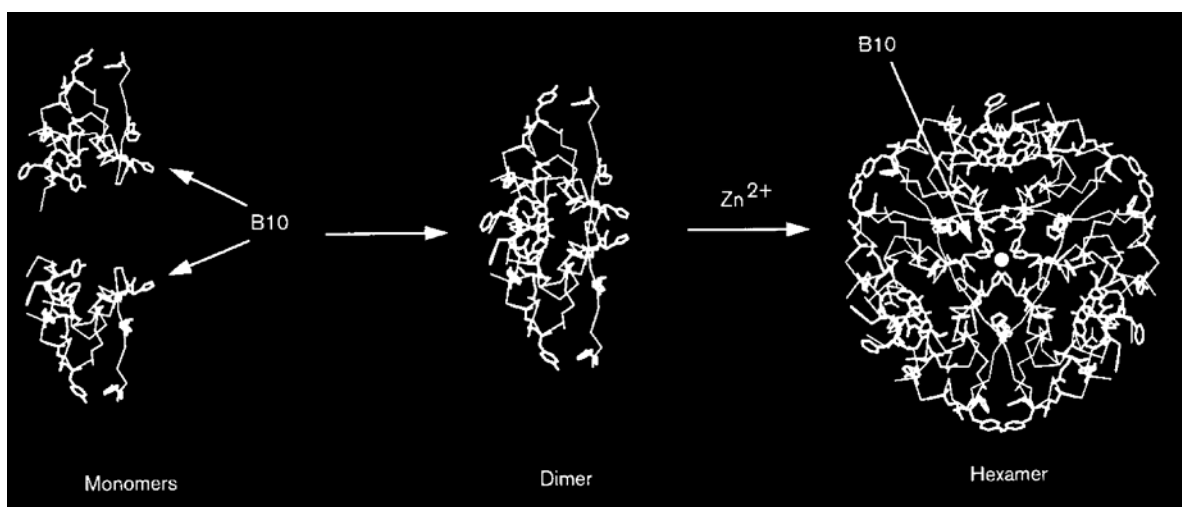
Deux autres familles de protéines nécessitent le zinc :

- les métallothionéines : Zn-thiolates, très abondantes (chélation, éventuellement transport)
- les protéines de régulation génique (plus de 500 contiennent du zinc) : facteurs de transcription, récepteurs possédant un "DNA-binding domain" (stéroïdes, acide rétinoïque,...), activateurs de gènes (Vallee et Falchuck, 1993).

Dans le système nerveux central, le zinc a été localisé au niveau des terminaisons nerveuses et des vésicules synaptiques des neurones excitateurs (Slomianka, 1992). L'ion est pris en charge et libéré avec le neurotransmetteur par le nerf (Assaf et Chung, 1984 ; Howell *et al.*, 1984), et agit comme un modulateur de la transmission synaptique et de la mort neuronale (Xie et Smart, 1991 ; Choi et Koh, 1998). Le zinc altère également le comportement de certains canaux ligand- ou voltage-dépendants (Harrison et Gibbons, 1994 ; Smart *et al.*, 1994).

Dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, le zinc est impliqué à différentes étapes de la biosynthèse d'insuline. L'insuline est stockée dans des granules sous la forme de cristaux de zinc et d'insuline (Blundell *et al.*, 1971 ; Dodson et Steiner, 1998). Un transporteur de zinc a d'ailleurs été mis en évidence au niveau des granules de sécrétion d'insuline (Chimienti *et al.*, 2004). Lors de la conversion de la pro-insuline en insuline, le zinc favorise la formation d'hexamères d'insuline (**Figure 43**) et leur cristallisation. Les concentrations de zinc dans les granules ont été estimées à 20 mM (Hutton *et al.*, 1983).

Etant donné que les hexamères de Zn-insuline se dissocient très vite (quelques secondes) après l'exocytose des granules (Gold et Grodsky, 1984), de fortes concentrations de zinc libre peuvent être produites localement.



**Figure 43 :** Formation des hexamères d'insuline en présence de  $Zn^{2+}$

(Dodson et Steiner, 1998)

## 1.2 Quelques mots sur le cadmium

Le cadmium est un élément métallique naturel composant la croûte terrestre. Il n'a aucun rôle physiologique et sa solubilité explique, en partie, qu'il soit plus toxique que les autres métaux lourds, exception faite du mercure (Nies, 1999). Le corps humain peut absorber le cadmium par ingestion ou inhalation. L'ingestion résulte de la contamination des aliments par la présence de cadmium dans le sol, l'atmosphère ou les fertilisants. L'inhalation a une contribution bien plus faible exceptée dans le cas des fumeurs qui doublent leur apport en cadmium (une cigarette contient 1 à 2  $\mu g$  de cadmium dont 10 % sont inhalés par le fumeur). L'organisation mondiale de la santé a établi une accumulation de cadmium tolérable à 1  $\mu g/kg$  corporel par jour. Les reins sont la principale cible du cadmium qui peut s'y accumuler de 20 à 30 ans. Mais il peut également causer des dommages sévères aux poumons, au foie, aux os et aux testicules. Les ions  $Cd^{2+}$  semblent être tératogènes et carcinogènes (Elinder *et al.*, 1985).

## 1.3 Les canaux $K_{ATP}$ et le zinc

Bancila *et al.* (2004) ont montré que de faibles concentrations de zinc appliquées sur des synaptosomes dépolarisés par la 4-aminopyridine restauraient le potentiel de membrane et

réduisaient la libération de glutamate. Etant donné que ces effets sont identiques lors de l'application de diazoxide et opposés lors de l'application de tolbutamide, les auteurs en déduisent qu'ils résultent de l'activation de canaux  $K_{ATP}$ . Ils montrent également que le zinc, en activant des canaux  $K_{ATP}$  pré-synaptiques, protège les neurones d'une hyper-excitation, d'une libération excessive de neurotransmetteur, et agirait ainsi comme un neuroprotecteur endogène lors des crises d'épilepsie ou d'attaques.

Des effets inhibiteurs de concentrations millimolaires de zinc extracellulaire sur la sécrétion d'insuline et l'activité électrique des cellules  $\beta$  pancréatiques ont été décrits (Ghafghazi *et al.*, 1981 ; Ferrer *et al.*, 1984 ; Aspinwall *et al.*, 1997). Ce feedback négatif est directement lié à un effet activateur réversible du zinc extracellulaire sur les canaux  $K_{ATP}$  des cellules  $\beta$  pancréatiques (Block *et al.*, 2000). Le zinc extracellulaire n'a aucun effet sur les  $K_{ATP}$  cardiaques qui sont composés de l'isoforme SUR2A ; en revanche le zinc intracellulaire stimule l'activité des canaux pancréatiques et cardiaques et n'a aucun effet sur la sous-unité Kir6.2 exprimée seule. Il semblerait donc qu'il y ait un effet du zinc interne et du zinc externe sur la sous-unité SUR (Prost *et al.*, 2004). En utilisant des chélateurs de zinc sur les différentes faces de la cellule, les auteurs pensent qu'il y aurait deux sites d'action du zinc localisés sur la sous-unité SUR. Par ailleurs Bancila *et al.* (2005) ont montré que cette interaction s'exerce par une liaison directe du zinc avec la protéine SUR1 du canal ; celle-ci s'effectue sur un site constitué de résidus histidines extracellulaires relativement proches, présentes uniquement dans l'isoforme SUR1 : His 326 et His 332.

## 1.4 Position du problème

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle il existe deux sites distincts de liaison du zinc, nous avons testé dans un premier temps l'effet du zinc interne sur les mutants histidines 326 et 332 de l'isoforme SUR1 constituant le site externe. Les deux histidines ont été mutées en alanine qui est un acide aminé neutre et peu encombrant incapable de faire une interaction ionique avec le cation ( $Zn^{2+}$ ). Nous avons construit deux simples mutants appelés SUR1(H326A) et SUR1(H332A) ainsi qu'un double mutant SUR1(H326,332A). Pour cela nous avons réalisé une mutagenèse dirigée par PCR suivie d'une transcription *in vitro*. Puis l'expression du canal s'est faite par co-injection des ARN de SUR1 et Kir6.2 dans l'ovocyte de Xénope.

Dans un second temps, au vu des résultats précédents qui confirment la présence d'un site interne au Zinc, nous avons essayé de le localiser, en privilégiant les résidus histidines intracellulaires communs aux deux isoformes SUR1 et SUR2A puisque les deux protéines sont sensibles au zinc interne. Nous nous sommes également intéressés à l'effet du cadmium, un autre métal lourd.

Dans les deux cas, nous avons caractérisé fonctionnellement ces canaux par la technique du patch-clamp afin d'observer ou non une perte de sensibilité des canaux mutants au zinc ou au cadmium intracellulaires.

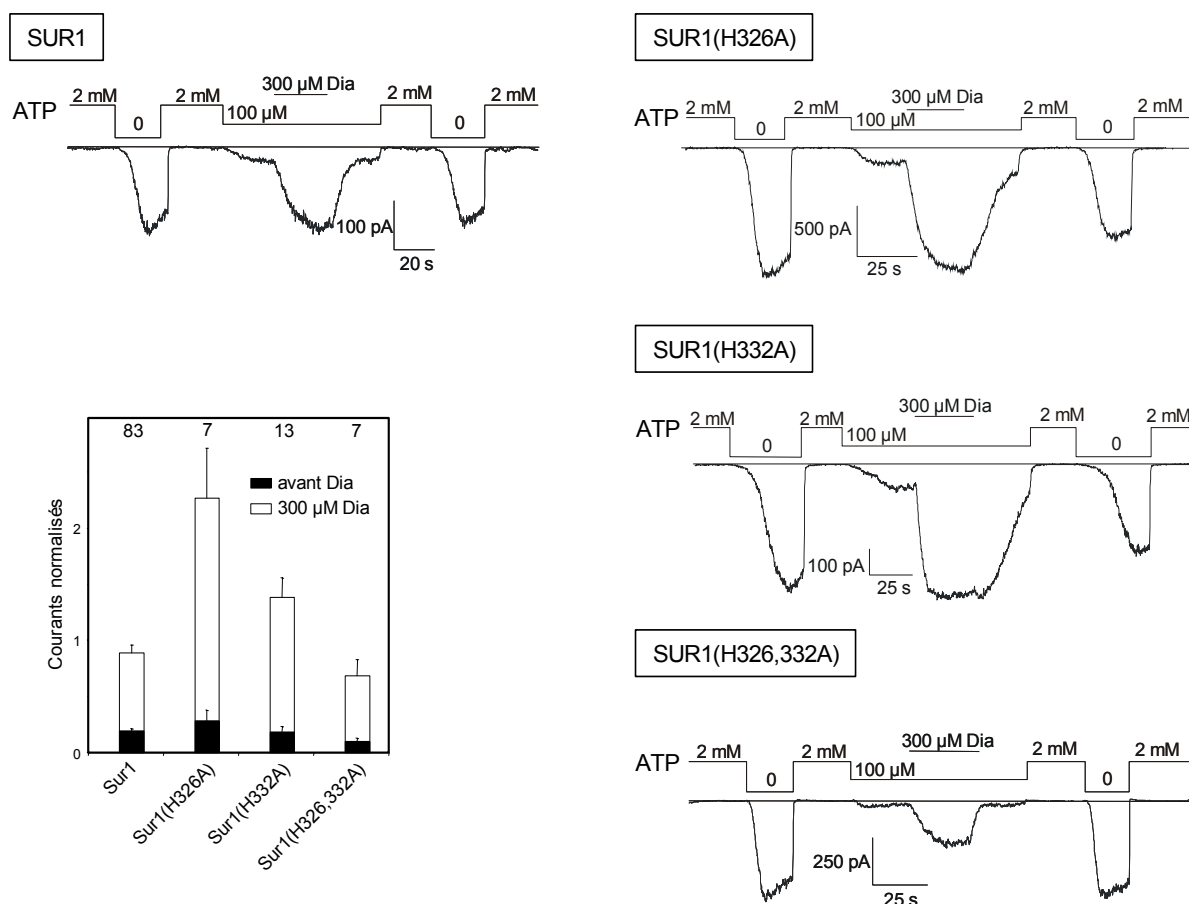
## **2 Résultats**

Bien que les résultats présentés ne soient que préliminaires, l'étude de la physiologie du zinc et du cadmium sur les canaux  $K_{ATP}$  ouvre de nombreuses perspectives sur leur implication dans la régulation des ces canaux.

### **2.1 Test de fonctionnalité des mutants histidines H326 et H332**

Avant toute chose, nous avons voulu nous assurer que la mutation des histidines extracellulaires H326 et H332 de SUR1 ne modifiait pas les propriétés pharmacologiques du canal. Pour cela, nous avons testé l'effet du diazoxide sur les canaux mutés (**Figure 44**).





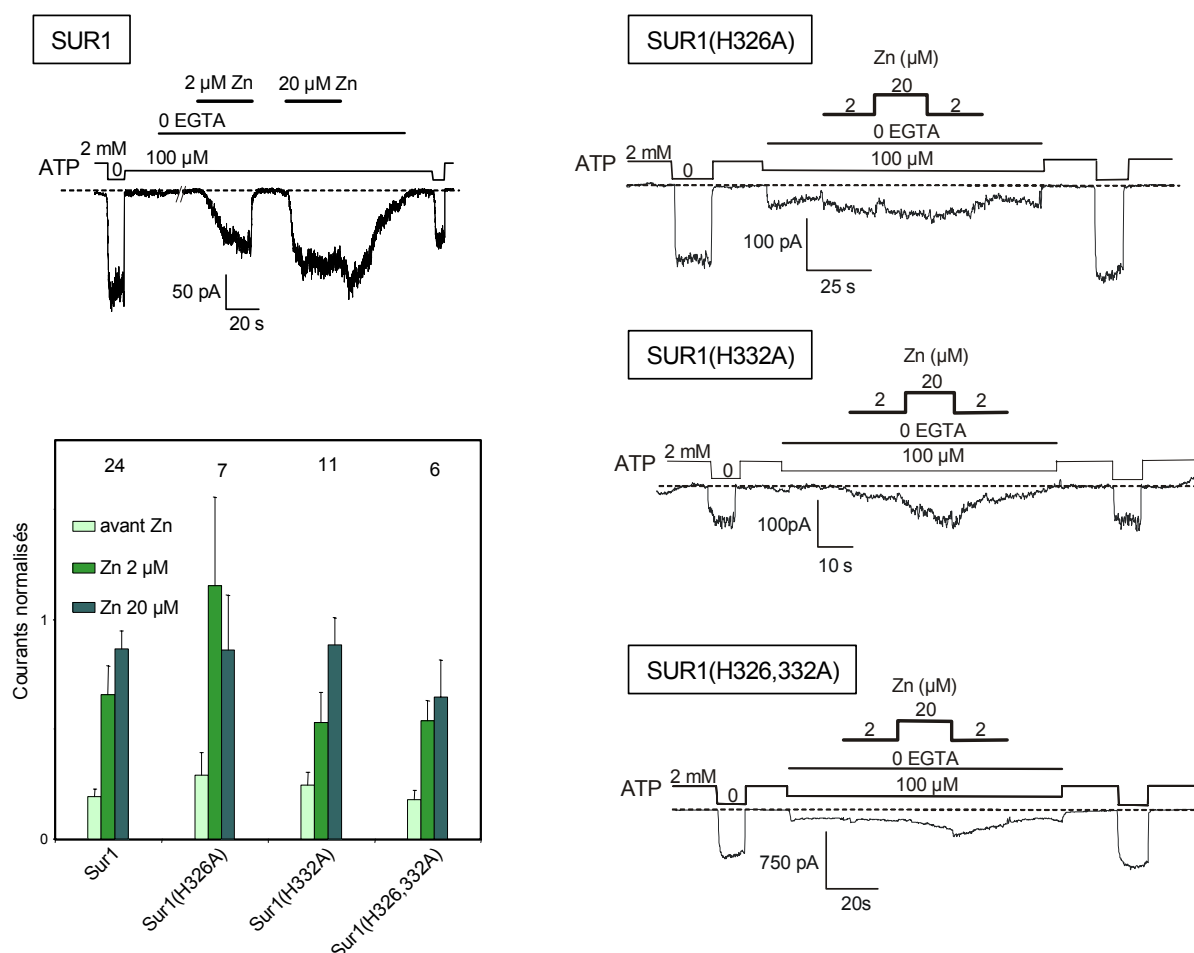
**Figure 44 :** Effet du diazoxide sur les canaux sauvages et mutants. En bas à gauche, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions avant (en noir) puis pendant (en blanc) l'application de 300  $\mu$ M de diazoxide. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50$  mV, sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR1, SUR1(H326A), SUR1(H332A) et SUR1(H326,332A). Dia = diazoxide

Les mutations n'ont pas modifié la réponse des canaux au diazoxide, nous pouvons donc envisager de tester la sensibilité au zinc intracellulaire.

## 2.2 Effet du zinc intracellulaire sur les mutants histidines H326 et H332

La mutation des histidines extracellulaires H326 et H332 de SUR1 n'a pas d'effet sur la sensibilité intracellulaire au zinc (**Figure 45**). Leur activation est en tout point semblable à celle de l'isoforme sauvage SUR1. Cette activation est d'autant plus importante que les concentrations en  $Zn^{2+}$  augmentent.

Le zinc ayant la propriété de se lier à l'ATP, nous avons effectué les calculs nécessaires pour que les concentrations indiquées correspondent au zinc libre.



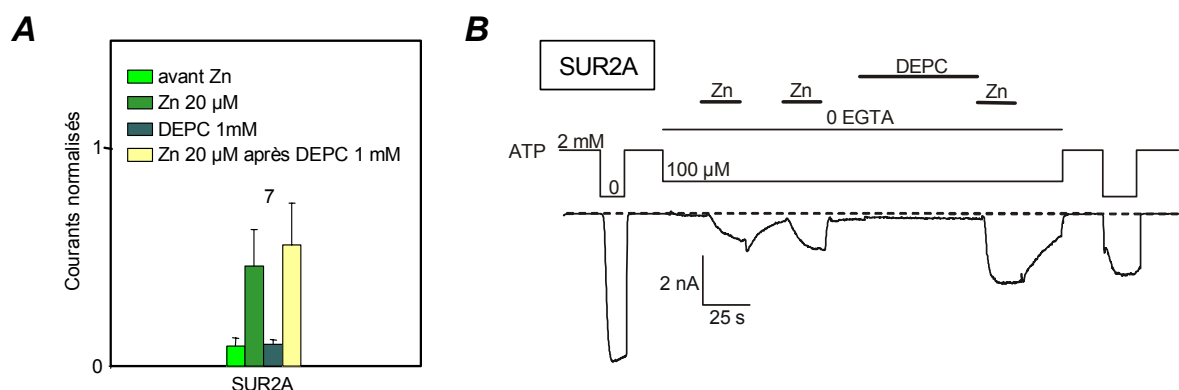
**Figure 45 :** Effet du zinc sur les canaux sauvages et mutants. En bas à gauche, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions avant (en vert clair) puis pendant (en vert et vert foncé) l'application de 2 et de 20  $\mu$ M de zinc. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50$  mV, sur des ovocytes de *Xénope* co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR1, SUR1(H326A), SUR1(H332A) et SUR1(H326,332A).

On pourrait même croire que le mutant H326 est plus sensible à 2  $\mu$ M de zinc que le type sauvage mais, compte tenu des barres d'erreur, ce résultat n'est pas significatif.

Par ailleurs on peut noter que l'activation par le zinc n'est pas un phénomène reproductible et que plusieurs applications sont souvent nécessaires avant d'obtenir une activation. Cette activation est alors croissante en fonction du nombre d'applications.

### 2.3 Effet du DEPC sur l'activation par le zinc intracellulaire

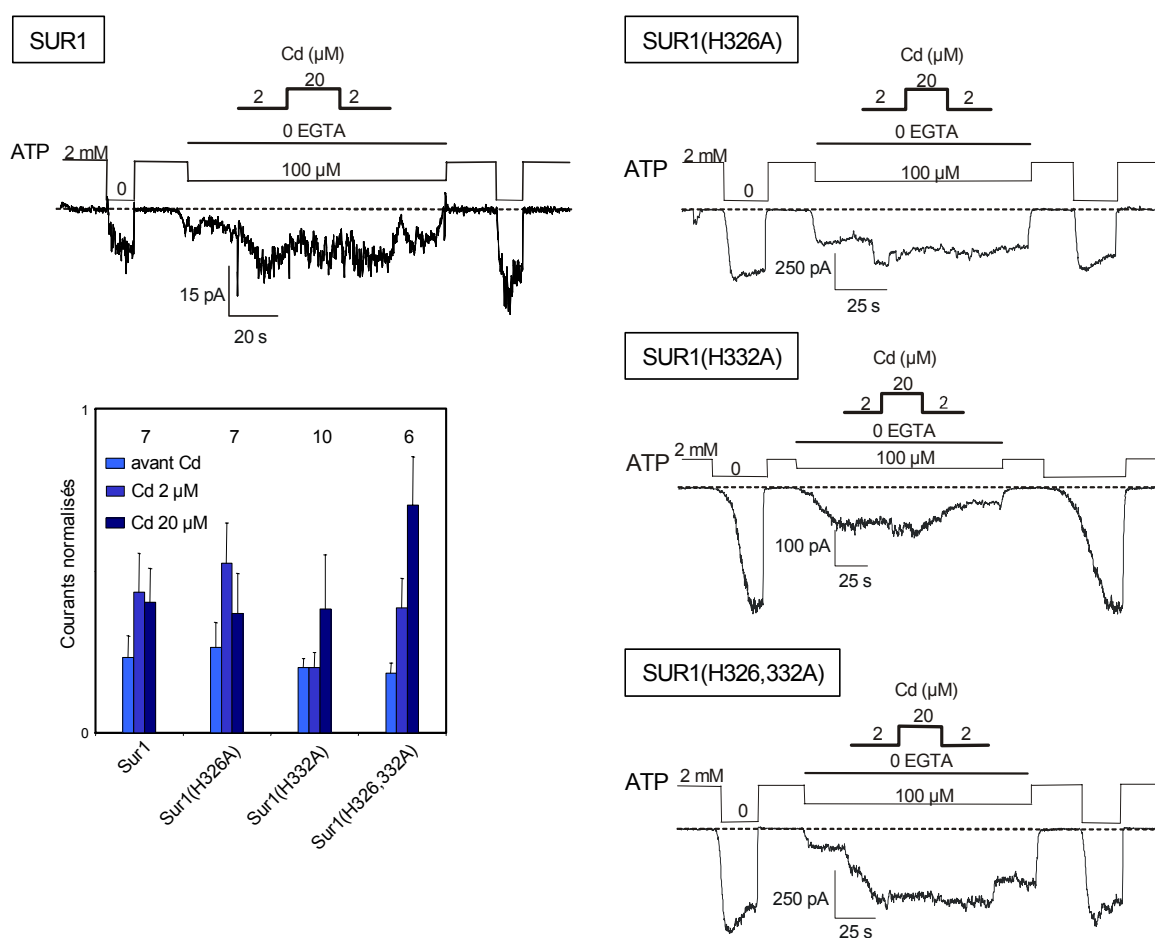
Pour confirmer le fait que ce ne sont pas des histidines qui sont impliquées dans le site intracellulaire de fixation du zinc, nous avons perfusé 1 mM de diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Le DEPC a la propriété de se fixer de manière irréversible sur les histidines. La **Figure 46** montre que la sensibilité au zinc intracellulaire de l'isoforme SUR2A n'est pas affectée par la perfusion préalable de DEPC. En revanche, il est plus difficile de conclure pour l'isoforme SUR1 qui, au moment des enregistrements, s'exprimait très peu et n'était pas ou peu sensible au zinc intracellulaire avant même la perfusion de DEPC. Les résultats obtenus pour SUR1 ne sont donc pas présentés pour ne pas conduire à une mauvaise interprétation. Cependant, il serait bon de refaire des essais ne serait-ce que pour s'assurer que le DEPC n'a aucun effet sur la sensibilité de l'isoforme SUR1 au  $Zn^{2+}$  interne.



**Figure 46 :** Effet du zinc (20 µM) sur les canaux sauvages SUR2A avant et après application de DEPC 1 mM. **A.** Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour SUR2A. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Le numéro indiqué au-dessus des barres désigne le nombre de patch pris en compte. **B.** Enregistrement de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50mV$ , sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et SUR2A.

## 2.4 Effet du cadmium intracellulaire sur les mutants histidines H326 et H332

Etant donné que la mutation des histidines extracellulaires H326 et H332 de SUR1 ne semble pas modifier leur sensibilité au zinc intracellulaire, nous avons voulu savoir s'il en était de même pour d'autres métaux lourds. Nous avons donc reproduit les mêmes expériences avec le cadmium. Loussouarn *et al.* (1999) ont montré que 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  inactive les canaux  $K_{ATP}$  via une cystéine (C166) de la sous-unité Kir6.2. Dans notre cas, bien que les traces soient difficiles à interpréter, à cause de la présence de canaux  $\text{Cl}^-$  activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  endogène, nous observons de légères activations (**Figure 47**).



**Figure 47 :** Effet du cadmium sur les canaux sauvages et mutants. En bas à gauche, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions avant (en bleu clair) puis pendant (en bleu et bleu foncé) l'application de 2 et de 20  $\mu\text{M}$  de cadmium. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des

*barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50mV$ , sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR1, SUR1(H326A), SUR1(H332A) et SUR1(H326,332A).*

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette apparente contradiction. Tout d'abord, l'ovocyte de Xénope présente de nombreux canaux  $Cl^-$  activables par le  $Ca^{2+}$  dont nous nous affranchissons en perfusant des solutions complémentées en EGTA. Or, pour ne pas chélater également les ions  $Cd^{2+}$  nous devons préparer nos solutions dépourvues d'EGTA. En jouant sur le potentiel nous tentons de nous placer au potentiel d'équilibre des canaux  $Cl^-$  (en général aux alentours de  $-30 mV$ ) mais cet ajustement dévie parfois. L'apparente activation que nous observons pour le  $Cd^{2+}$  résulte ainsi peut-être d'une superposition des canaux  $K_{ATP}$  à ces canaux  $Cl^-$ .

Ensuite, on peut relever certaines dissemblances dans les méthodes de mesure entre nos expériences et celles de Loussouarn. Ainsi, l'effet inhibiteur du  $Cd^{2+}$  est observé en absence d'ATP, alors que nous travaillons en présence de  $100 \mu M$  d'ATP. Les auteurs ont d'ailleurs montré que l'effet du  $Cd^{2+}$  sur leurs mutants était grandement réduit en présence de concentrations inhibitrices d'ATP. Par ailleurs, la présence de  $PIP_2$ , qui augmente la probabilité d'ouverture du canal, réduit également l'effet inhibiteur du  $Cd^{2+}$ . L'inversion de la tendance pourrait s'expliquer par le fait que nos patchs présentaient de fort taux de  $PIP_2$ . Ensuite, pour leurs expériences ils transfectent des cellules COSm6 qui présentent peu de canaux chlore activés par le  $Ca^{2+}$  et ils utilisent le KF pour chélater les ions calcium résiduels. Enfin, dernière remarque, certes peu probable, mais à noter cependant, leurs expériences portent sur une forme tronquée de Kir6.2 qui est susceptible de former des canaux en absence de SUR (bien qu'ils co-transfectent SUR1 et Kir6.2 $\Delta C36$ ). Dans notre cas, les deux sous-unités sont forcément présentes puisque nous co-injectons la forme entière de Kir6.2 à la sous-unité SUR1 sauvage ou mutante. Ainsi, la modulation de SUR1 par le  $Cd^{2+}$  pourrait masquer l'effet inhibiteur de cet ion sur la sous-unité Kir6.2.

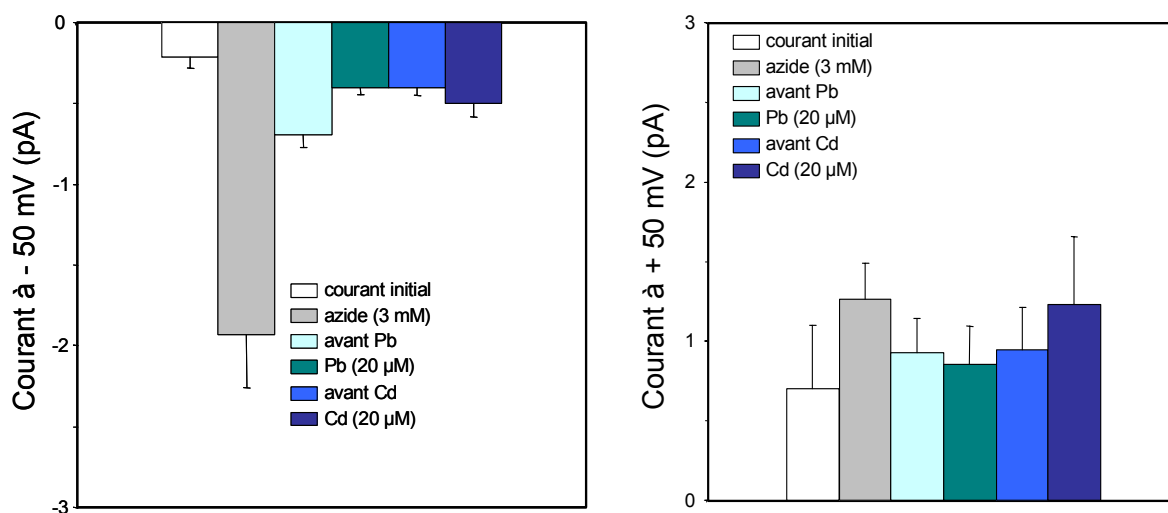
Quoi qu'il en soit, les résultats présentés ne sont que préliminaires et d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ou infirmer ces hypothèses.

## **2.5 Effet du cadmium et du plomb extracellulaires sur les canaux sauvages SUR1**

Pour tester l'effet des métaux lourds externes sur l'activité du canal, nous exprimons le canal SUR1/Kir6.2 dans l'ovocyte de Xénope et mesurons la totalité des courants

traversant la cellule grâce à la technique de double-électrode décrite plus haut (Chapitre III).

Le canal est au préalable activé par le nitrure de sodium (azide), un inhibiteur du cytochrome  $a_3$  et de la  $F_1/F_0$  ATPase, qui permet de diminuer les taux d'ATP intracellulaires et d'assurer ainsi une augmentation des courants  $K_{ATP}$ . On vérifie ainsi la bonne expression des canaux. L'aspect inhibiteur du plomb (**Figure 48**) résulte très certainement d'un effet latent de l'azide malgré un lavage de plus de 5 min. Le plomb et le cadmium ne semblent pas activer les canaux  $K_{ATP}$  via l'extérieur compte-tenu des barres d'erreur.



**Figure 48 :** Effet du plomb et du cadmium extracellulaires sur des ovocytes de *Xénope* exprimant des canaux sauvages SUR1/Kir6.2. Histogrammes représentant la moyenne des courants mesurés grâce à la technique de double-électrode avant (en blanc) puis pendant (en gris) la perfusion de 3 mM d'azide, avant (en vert clair) puis pendant (en vert foncé) la perfusion de 20  $\mu$ M de plomb et avant (en bleu) puis pendant (en bleu foncé) la perfusion de 20  $\mu$ M de cadmium. Le nombre de patch pris en compte est de 7. A gauche, courants (en pA) mesurés à  $-50$  mV et à droite, courants (en pA) mesurés à  $+50$  mV

### 3 Conclusion et perspectives

Tout semble confirmer l'hypothèse selon laquelle il existe deux sites de liaison du zinc au niveau du récepteur des sulfonylurées SUR. Un site externe, uniquement présent sur l'isoforme SUR1 et dépendant des histidines 326 et 332 (Bancilla *et al.*, 2005) et un site interne présent sur les deux isoformes SUR1 et SUR2A qu'il reste encore à identifier.

Nos résultats préalables semblent indiquer que ce site interne n'est pas constitué d'histidines (ou tout du moins d'histidines intracellulaires accessibles) puisque l'application de DEPC du côté interne n'abolit pas la sensibilité au zinc. Il faut également noter que la sensibilité au zinc s'accompagne d'une sensibilité au cadmium, autre métal lourd qui présente des propriétés chimiques semblable au zinc. En revanche, on ne peut pas dire si ce site interne est commun aux deux isoformes ou s'il s'agit de sites distincts.

La liaison du zinc ou du cadmium peut impliquer de nombreux acides aminés de nature très variée : glutamate, aspartate, cystéine ou histidine. Ceci rend d'autant plus complexe l'identification du site. Dans la même optique que l'utilisation du DEPC, on peut envisager l'emploi d'iodoacétamide ou de  $\beta$ -mercaptoéthanol qui ont respectivement la propriété de faire des liaisons covalentes avec les soufres ou d'entrer en compétition avec les thiols du site de liaison du zinc. Ceci permettrait de savoir si ce sont des cystéines qui sont impliquées dans le site.

La mutagenèse dirigée de tous les acides aminés glutamates, aspartates, cystéines ou histidines intracellulaires n'est pas envisageable. Ils sont d'une part trop nombreux, d'autre part il faudrait pour cela disposer d'une structure tridimensionnelle de SUR pour localiser des sites putatifs de liaison du zinc impliquant des acides aminés qui peuvent être relativement éloignés dans la séquence primaire.

Enfin, comme mentionné plus haut, les effets du zinc et du cadmium ne sont pas des phénomènes parfaitement reproductibles et souvent plusieurs applications sont nécessaires pour obtenir une activation d'amplitude variable. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que le zinc active indirectement les canaux  $K_{ATP}$  via la protéine kinase C (Csermely *et al.*, 1988 ; De Weille *et al.*, 1989). Dans cette hypothèse, celle-ci doit donc nécessairement être présente dans le morceau de membrane isolé pour que l'on observe un effet du zinc. Mais cette explication ne concorde pas vraiment avec la rapidité de l'activation et de son lavage.

L'action du zinc au niveau physiologique est aisément explicable. Ainsi, en activant les canaux  $K_{ATP}$  de la cellule  $\beta$  pancréatique les ions  $Zn^{2+}$ , libérés lors de la sécrétion d'insuline, exercent une boucle de rétrocontrôle pour inhiber cette sécrétion. On peut également penser que l'activation des canaux  $K_{ATP}$  par le zinc permet de minimiser la force de contraction du myocarde au cours d'une ischémie (Terzic et Vivaudou, 2001) exerçant ainsi indirectement une fonction protectrice du myocarde. Bien que les concentrations

nanomolaires évaluées à l'intérieur des cellules soient bien inférieures à celles utilisées pour cette étude, on peut supposer qu'il existe des compartimentations cellulaires où ses concentrations peuvent localement augmenter. La sensibilité au cadmium interne semble indiquer que sa liaison à SUR induise des changements de conformation qui sont transmis au canal Kir6.2 pour son activation. L'effet inhibiteur observé sur la sous-unité Kir6.2 (Loussouarn *et al.*, 2000) serait ainsi masqué. Mais des expériences complémentaires sont à envisager pour proposer un mécanisme d'activation. En particulier, nous pourrions envisager d'étudier la sensibilité des canaux  $K_{ATP}$  aux métaux lourds en utilisant une sous-unité SUR non fonctionnelle (mutée au niveau de ses NBD pour supprimer toute activité ATPase). Ceci permettrait également de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse que le métal soit un substrat du transporteur SUR.





*Un domaine riche en acides  
aminés chargés négativement*

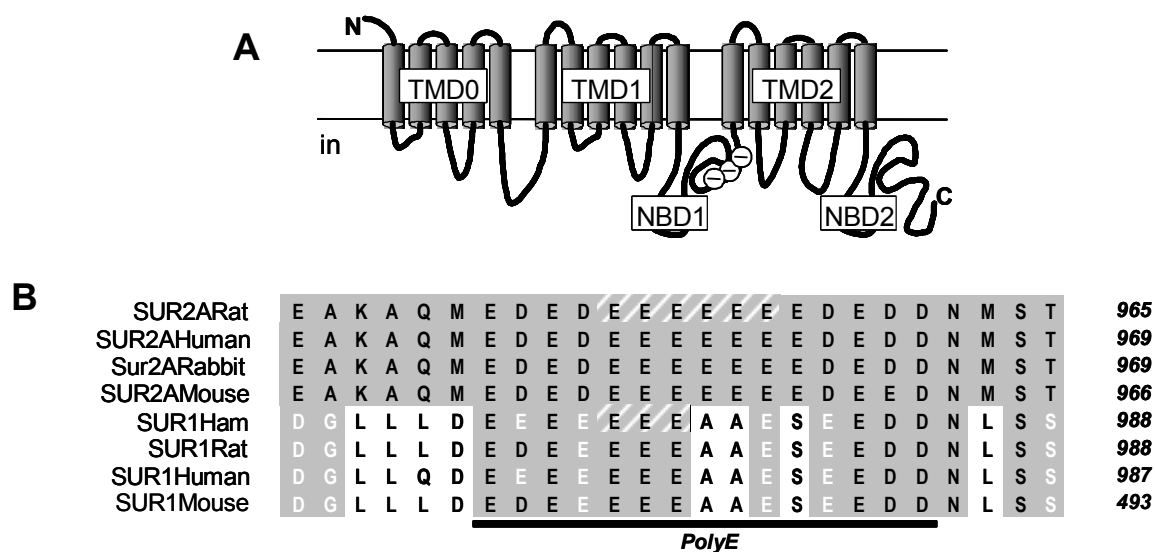


## 1 Avant-propos

Les résultats présentés dans cette étude ne permettent pas de conclure précisément sur le rôle de ce domaine riche en acides aminés chargés négativement mais ils ouvrent sur de nombreuses perspectives qui me semblaient importantes de mentionner dans ce manuscrit.

## 2 Position du problème

Dans le cadre de l'étude de la pharmacologie moléculaire de la sous-unité SUR des canaux  $K_{ATP}$ , nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une zone très conservée et très riche en résidus glutamates située entre le domaine NBD1 et la douzième hélice transmembranaire (**Figure 49A**). Cette zone regroupe 15 résidus chargés négativement (glutamates surtout, et quelques aspartates) (**Figure 49B**). Le grand nombre de cas rapporté jusqu'alors (dans de nombreuses autres protéines) mais dont le rôle est incertain voire inconnu, nous a interpellé quant à sa fonction au sein de cette sous-unité régulatrice du canal  $K_{ATP}$ .



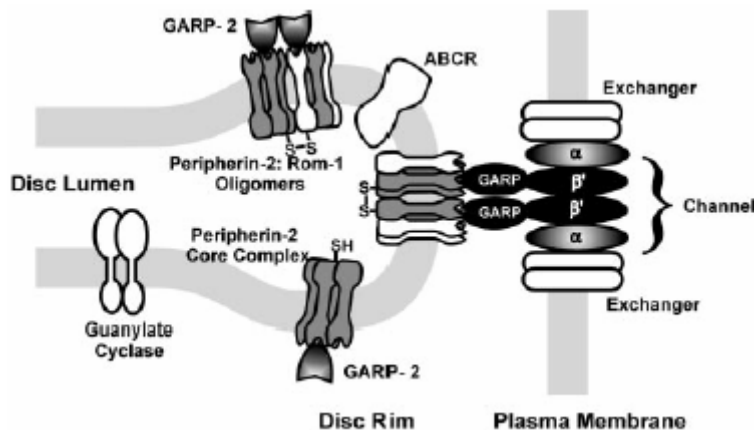
**Figure 49** : **A.** Localisation du PolyE (figuré par des signes moins entourés de cercles blancs) au niveau de la structure prédite de la protéine SUR entre le NBD1 et la douzième hélice transmembranaire. **B.** Alignement de séquences peptidiques de SUR2A et de SUR1 de différentes espèces. Les résidus identiques sont figurés en noir sur fond gris, les résidus homologues en blanc sur fond gris. Les résidus mutés sur les deux isoformes sont mentionnés par une hachure blanche sur fond gris. L'enchaînement des 15 résidus chargés négativement est souligné d'un trait noir et

désigné par le terme *PolyE*.

Une telle région Poly E a été décrite dans les canaux Kv1.4 (N-ter), cGMP (sous-unité  $\beta$ ) et Ryr (ryanodine receptor).

Dans les canaux cGMP, les régions GARP (Glutamic Acid Rich Protein) servent d'ancrage à la peripherin-2 (*Figure 50*).

Dans Ryr, un rôle possible de ces régions serait la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 50 :** Implication des GARP (Glutamic Acid Reach Protein) dans les interactions protéine/protéine. Dans la membrane plasmique, le canal hétérotétramérique cGMP interagit avec l'échangeur dimérique Na/Ca-K. Le canal interagit également avec la peripherin-2 grâce à ces régions GARP.

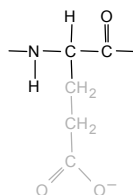
(Poetsch *et al.*, 2001)

Notre travail s'est basé sur la construction de mutants de ce récepteur, leur expression hétérologue dans l'ovocyte de Xénope, et leur caractérisation fonctionnelle par la technique du patch-clamp.

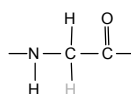
Nous avons concentré nos efforts sur les deux isoformes SUR1 et SUR2A. Les mutations ont porté, dans un premier temps, sur trois résidus glutamates (E) présents chez les deux isoformes. Puis, compte-tenu des résultats obtenus, nous avons poursuivi nos travaux en mutant 3 résidus supplémentaires de l'isoforme SUR2A. Deux types de mutations ont été envisagés :

- l'une, dite neutre, substituant trois glycines aux glutamates ;
- l'autre, plus drastique, substituant trois lysines aux glutamates.

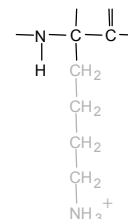
Glutamate



Glycine



Lysine



En effet, la glycine est l'acide aminé le plus simple, sans chaîne latérale, alors que la lysine est, d'un point de vue encombrement stérique, beaucoup plus grosse, avec une chaîne latérale chargée positivement, à l'inverse des glutamates.

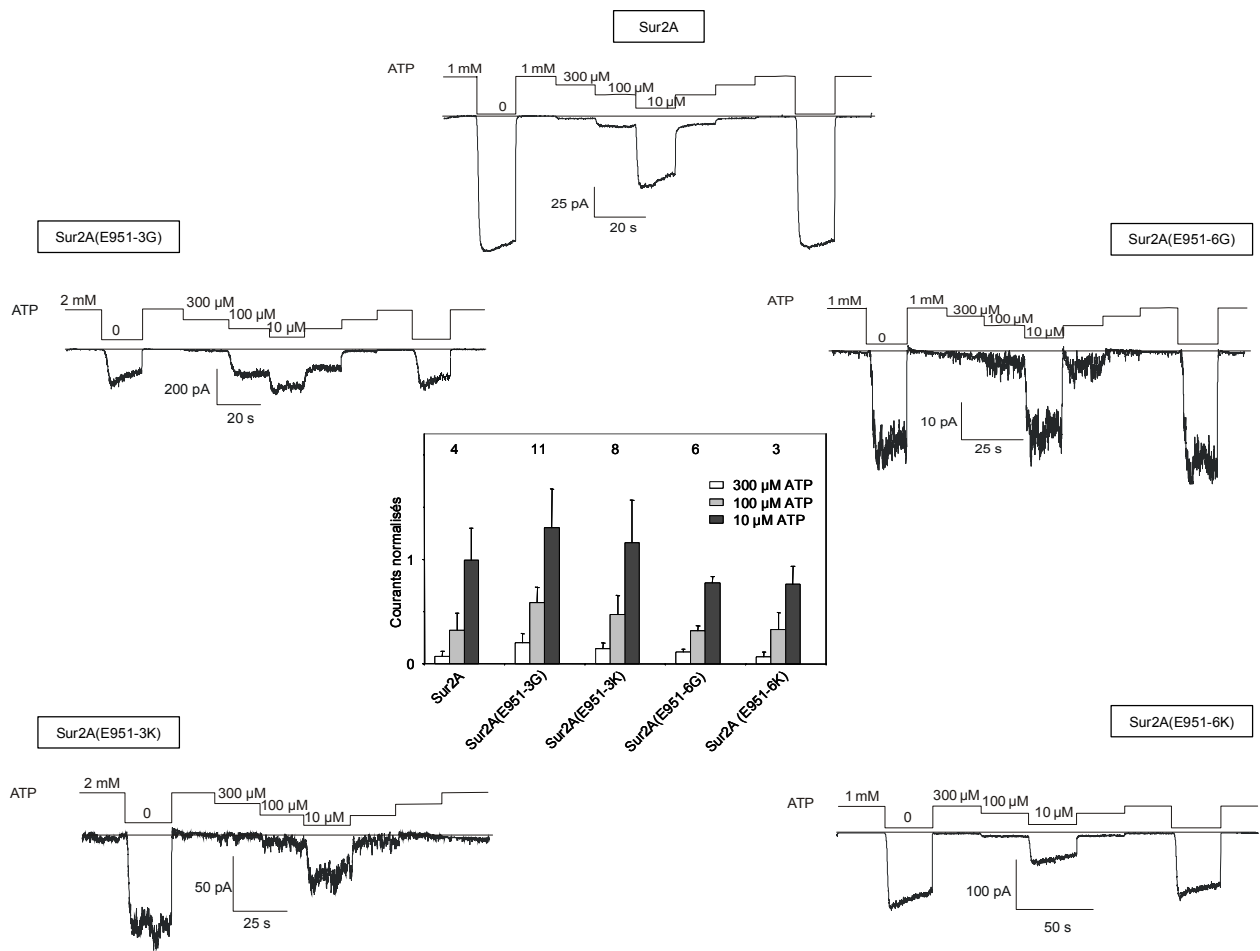
Ces mutations ont porté sur les résidus 951, 952 et 953 (puis 954, 955 et 956) de la séquence peptidique de SUR2A, et sur les résidus 974, 975 et 976 de la séquence peptidique de SUR1. C'est pourquoi, nous les nommerons par la suite SUR2A(E951-3G), SUR2A(E951-3K), SUR2A(E951-6G), SUR2A(E951-6K), SUR1(E974-6G) et SUR1(E974-6K).

### 3 Résultats

Afin de confirmer l'expression correcte des canaux SUR1/Kir6.2 et SUR2A/Kir6.2 et de comparer leurs propriétés à celles des canaux mutants, ces canaux ont été caractérisés par leur sensibilité aux ouvreurs, leur sensibilité à l'ATP ainsi qu'à l'ADP, et leur sensibilité au glibenclamide, une sulfonylurée, bloqueur spécifique des canaux  $K_{ATP}$ .

#### 3.1 Inhibition par l'ATP

L'ATP inhibe les canaux  $K_{ATP}$  de manière dose-dépendante. A des concentrations millimolaires d'ATP, les canaux sont complètement fermés et s'ouvrent progressivement lorsqu'on diminue les concentrations d'ATP de la solution baignant la face cytoplasmique du canal. Le graphique dose-réponse, tracé à partir de mesures de courants à différentes concentrations d'ATP, permet de mesurer l'affinité de l'ATP pour le canal (**Figure 51**). Plus la constante  $K_{1/2}$  est élevée, moins le canal est sensible à l'ATP.



**Figure 51 :** Effet de l'ATP sur les canaux sauvages et mutants. Au centre, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus aux concentrations d'ATP indiquées pour chacune des constructions (sauvages et mutées). Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp (configuration excisée « inside-out » à -50 mV) des canaux SUR2A/Kir6.2, SUR2A(E951-3G)/Kir6.2, SUR2A(E951-3K)/Kir6.2, SUR2A(E951-6G)/Kir6.2 et SUR2A(E951-6K)/Kir6.2.

Les constantes  $K_{1/2}$  de nos constructions mutantes et sauvages sont présentées dans le tableau suivant. Ces valeurs sont élevées par rapport aux valeurs habituelles (de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{M}$ ) mais le  $K_{1/2}$  pour l'ATP de ces canaux est notoirement variable, car soumis à des facteurs difficilement contrôlables comme la concentration membranaire de phosphatidyl inositol-4,5-diphosphate ( $\text{PIP}_2$ ).

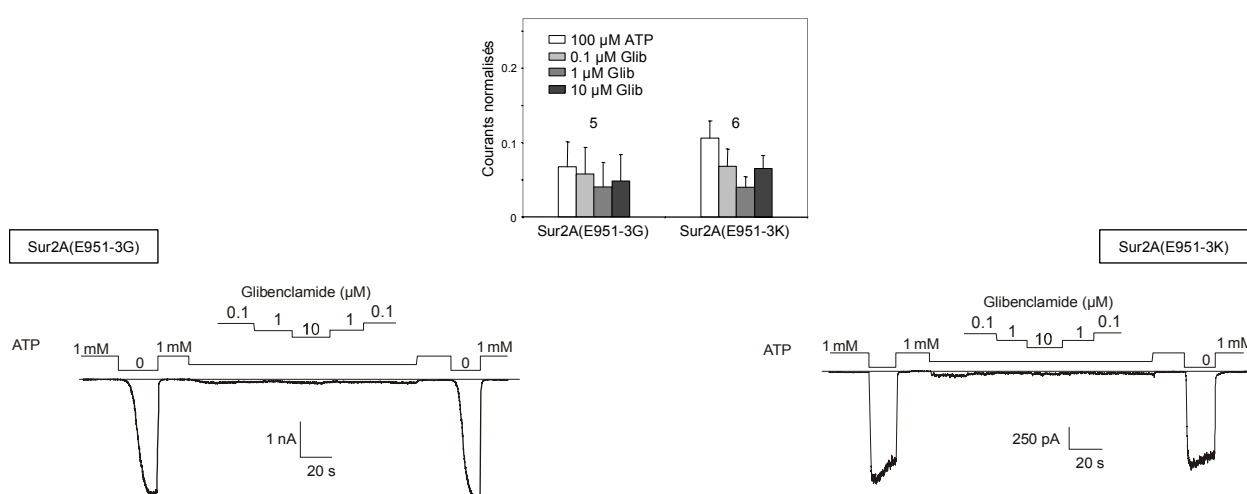
Constructions	SUR2A	SUR2A	SUR2A	SUR2A	SUR2A
---------------	-------	-------	-------	-------	-------

		(E951-3G)	(E951-3K)	(E951-6G)	(E951-6K)
K <sub>1/2</sub> (en $\mu$ M)	60	100	90	60	60

### 3.2 Blocage par le glibenclamide

L'application du glibenclamide permet de confirmer que les courants enregistrés proviennent bien de courants ioniques à travers des canaux K<sub>ATP</sub>. En effet, les canaux ouverts en absence d'ATP sont fermés par la sulfonylurée. De plus, l'effet inhibiteur est réversible, on retrouve l'activité de départ après l'action du glibenclamide (**Figure 52**).

L'inhibition obtenue pour les canaux mutants est en tout point comparable aux résultats publiés concernant le type sauvage SUR2A : la sulfonylurée, pour des concentrations s'étalant de 0.1 à 100  $\mu$ M, bloque à plus de 90 % les canaux K<sub>ATP</sub>. Mais pour juger plus aisément de l'effet du glibenclamide, ces manipulations auraient du être faites en absence d'ATP (ou du moins à de plus faibles concentrations).



**Figure 52.** Blocage par le glibenclamide. En haut, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions aux concentrations de glibenclamide indiquées. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. En bas, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50$  mV, sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR2A(E951-3G) et SUR2A(E951-3K). Des concentrations croissantes de glibenclamide sont appliquées en présence de 100  $\mu$ M d'ATP.

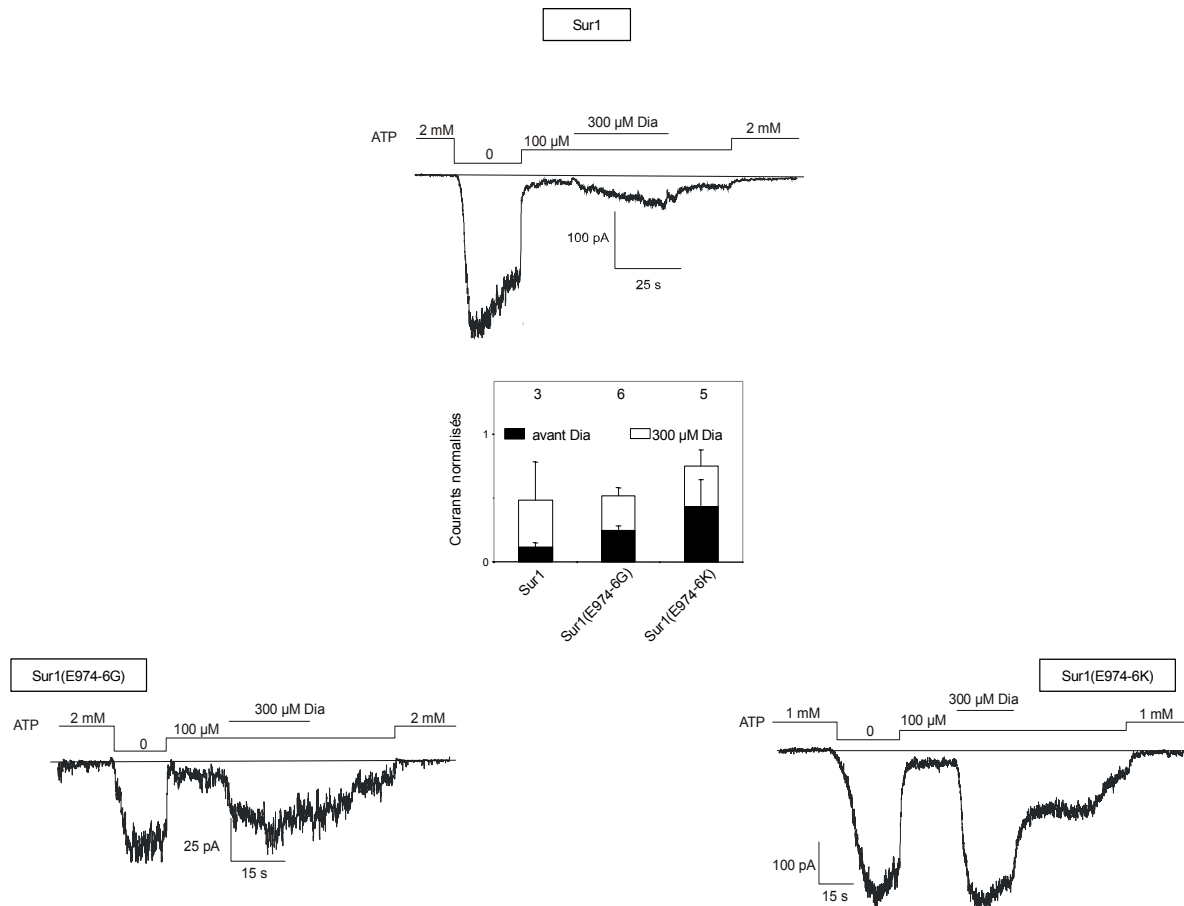


### 3.3 Action des ouvreurs

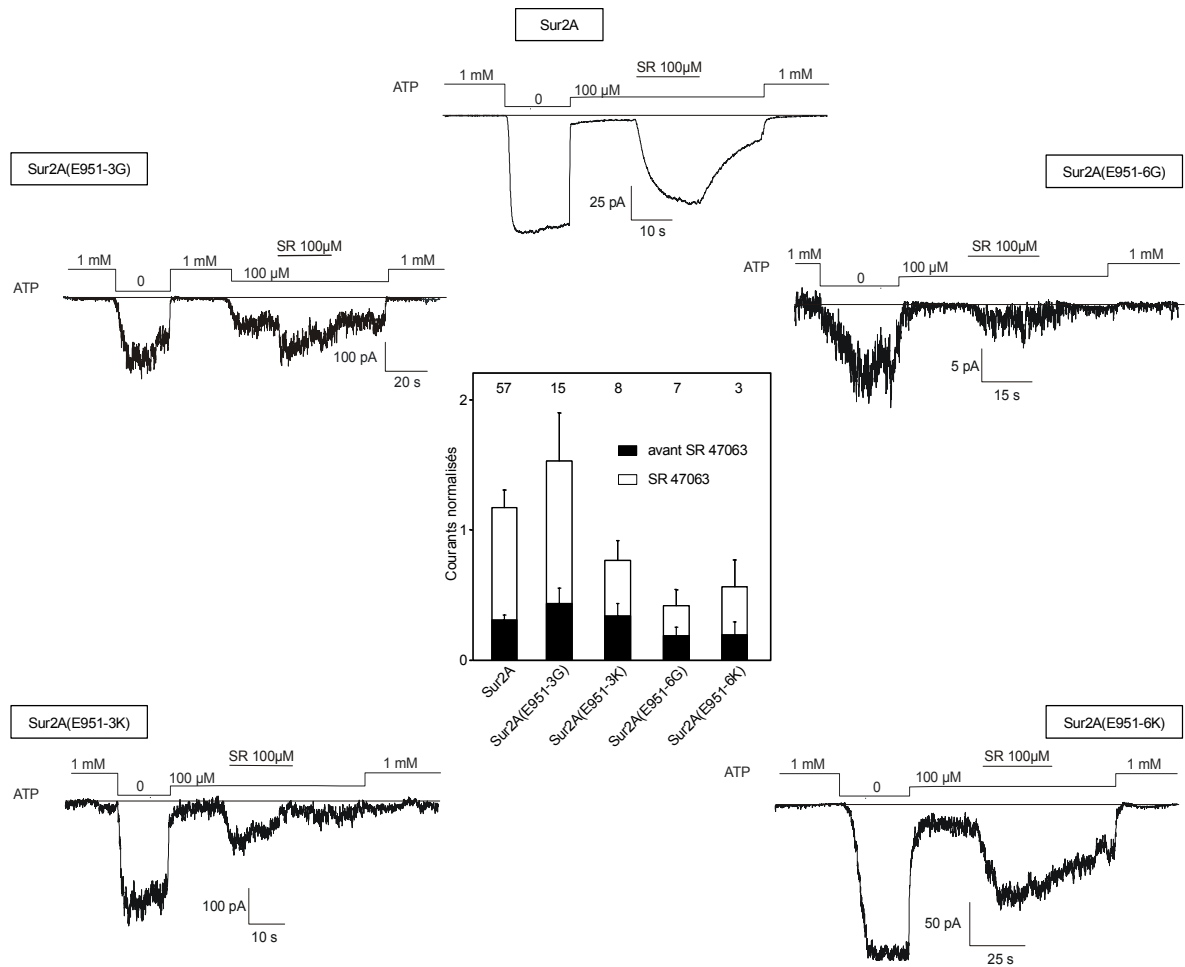
Pour discerner l'effet des ouvreurs, le canal doit être au préalable fermé par l'ATP, l'ouvreur agissant en diminuant l'inhibition par l'ATP (Forestier *et al.*, 1996). Cet effet étant compétitif, il est nécessaire d'utiliser une dose suffisante d'ATP sans être excessive. Nous avons utilisé 100  $\mu$ M d'ATP pour nos mesures expérimentales.

L'isoforme SUR1 se distingue des autres isoformes par sa sensibilité pharmacologique. Seul le diazoxide est capable d'activer les canaux  $K_{ATP}$  comportant la sous-unité SUR1. L'isoforme SUR2A est activable par tous les autres ouvreurs potassiques. Nous avons donc testé l'effet du diazoxide sur les mutants SUR1 (**Figure 53**) et l'effet du SR47063 (analogue du Cromakalim) (**Figure 54**) et du P1075 (analogue du Pinacidil) sur les mutants SUR2A (**Figure 55**).

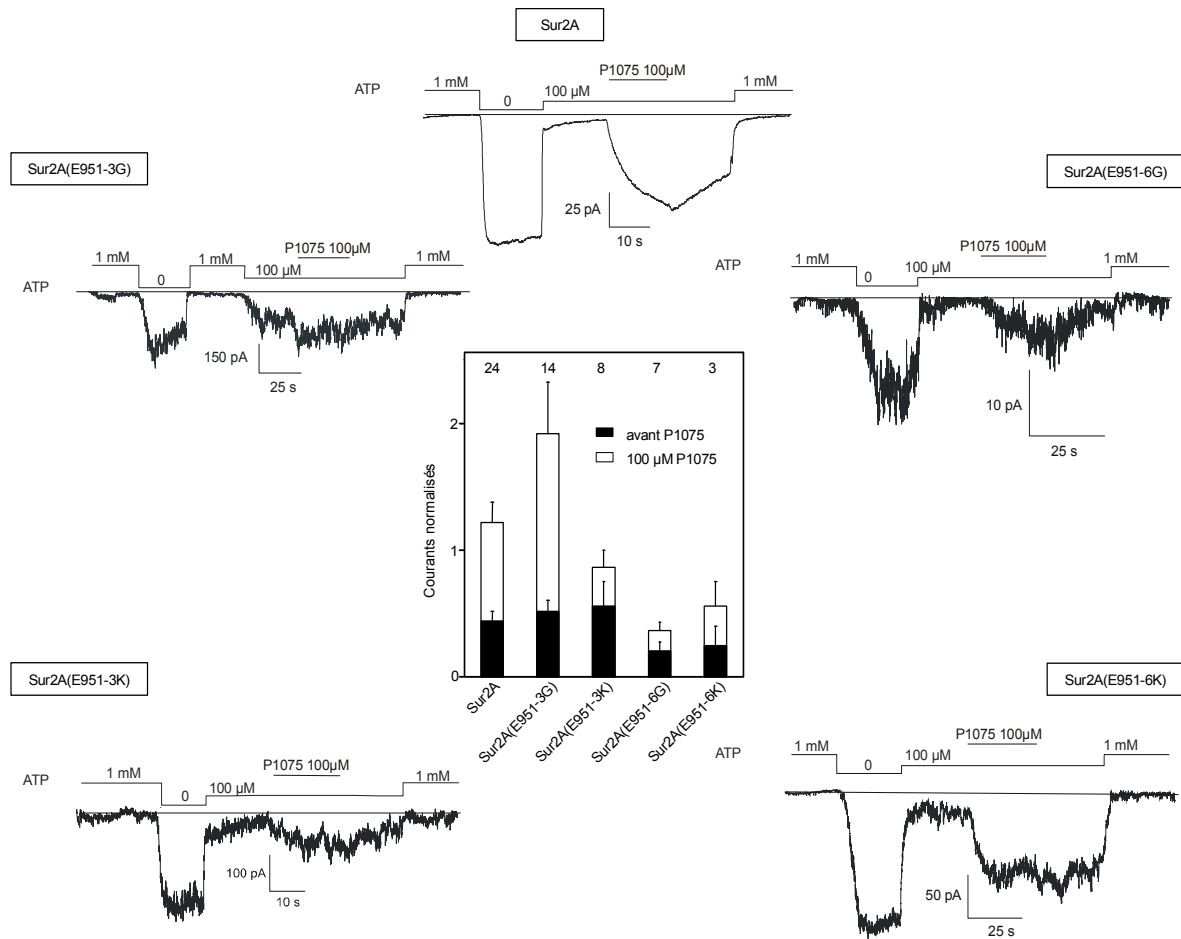
L'effet des ouvreurs est variable d'un mutant à l'autre : alors que les mutants de l'isoforme SUR1 ne semblent pas affectés dans leur réponse au diazoxide, les mutants SUR2A répondent moins bien à l'activation des ouvreurs exception faite du triple mutant glycine.



**Figure 53** Effet du diazoxide sur les canaux sauvages et mutants. Au centre, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions avant (en noir) puis pendant (en blanc) l'application de 300  $\mu$ M de diazoxide. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50$  mV, sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR1, SUR1(E974-6G) et SUR1(E974-6K). Dia = diazoxide



**Figure 54** Effet du SR47063 (analogue du Cromakalim) sur les canaux sauvages et mutants. Au centre, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions avant (en noir) puis pendant (en blanc) l'application de 100 μM de SR47063. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50\text{mV}$ , sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR2A, SUR2A(E951-3G), SUR2A(E951-3K), SUR2A(E951-6G) et SUR2A(E951-6K). SR = SR47063

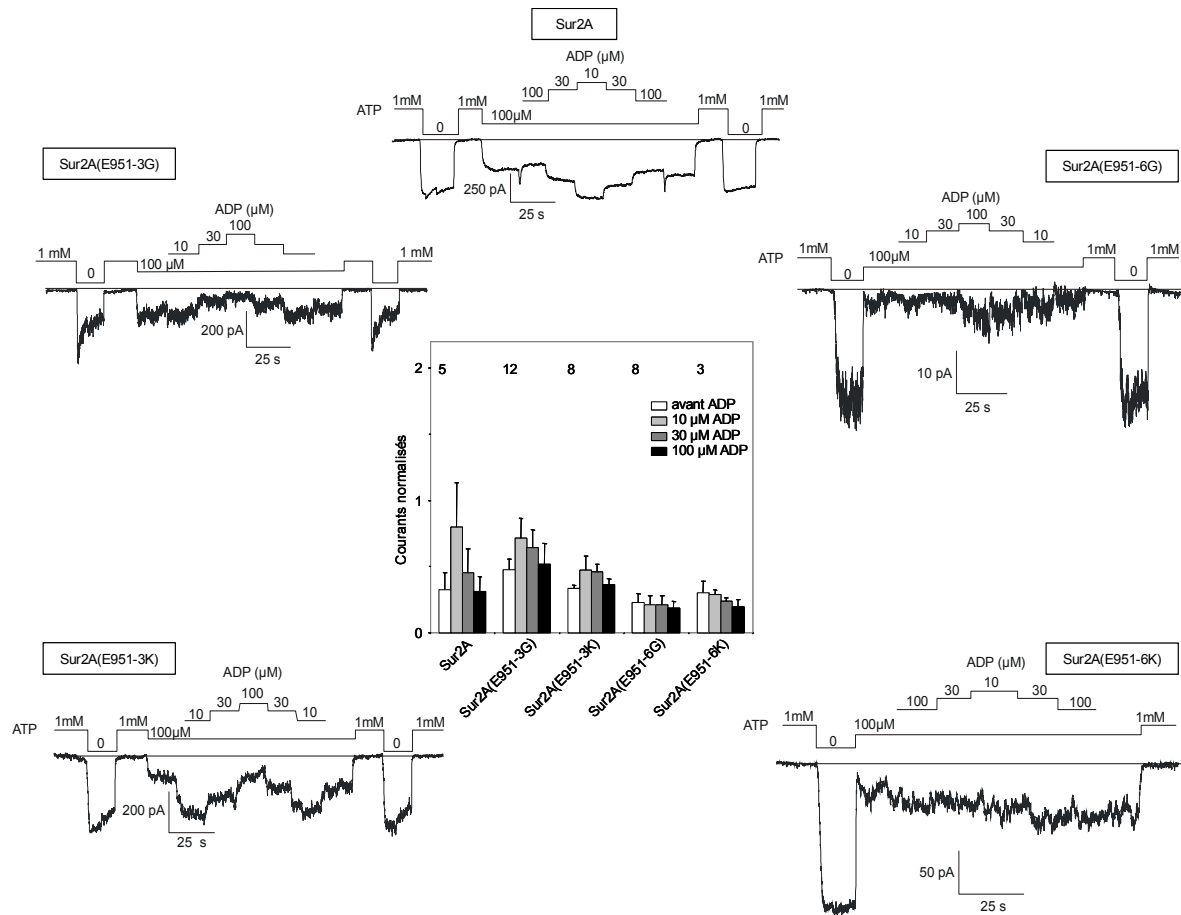


**Figure 55** Effet du P1075 (analogue du Pinacidil) sur les canaux sauvages et mutants. Au centre, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chacune des constructions avant (en noir) puis pendant (en blanc) l'application de 100  $\mu$ M de P1075. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50$  mV, sur des ovocytes de Xénope co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR2A, SUR2A(E951-3G), SUR2A(E951-3K), SUR2A(E951-6G) et SUR2A(E951-6K).

### 3.4 Sensibilité à l'ADP

L'effet de l'ADP est l'un des plus difficiles à interpréter. En effet, c'est un phénomène très variable et peu reproductible d'une cellule à l'autre et même d'un patch à l'autre.

Quoi qu'il en soit, il semblerait que la sensibilité à l'ADP diffère quelque peu suivant la construction considérée (**Figure 56**). Alors que l'ADP est activateur pour le type sauvage et les triples mutants SUR2A, il ne semble pas avoir d'effet, voire être inhibiteur à forte concentration chez les constructions SUR2A mutées 6 fois.



**Figure 56** Effet de l'ADP sur les canaux sauvages et mutants. Au centre, histogramme représentant la moyenne des courants obtenus aux concentrations d'ADP indiquées pour chacune des constructions. Les valeurs sont normalisées par rapport au courant mesuré en absence d'ATP. Les numéros indiqués au-dessus des barres désignent le nombre de patch pris en compte. A la périphérie, enregistrements de patch-clamp en configuration excisée inside-out, à  $V_m = -50mV$ , sur des ovocytes de *Xénope* co-exprimant Kir6.2 et les récepteurs SUR2A, SUR2A(E951-3G), SUR2A(E951-3K), SUR2A(E951-6G) et SUR2A(E951-6K).

## 4 Discussion

### 4.1 Régulation du canal par l'ATP

Les caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux  $K_{ATP}$  mutants sont très comparables à celles des canaux sauvages. Cependant, il est difficile de se prononcer sur une éventuelle perte de sensibilité à l'ATP liée aux mutations réalisées. D'autant plus que, en patch excisé, les canaux  $K_{ATP}$  présentent une variabilité considérable de sensibilité à l'ATP, liée probablement à la composition lipidique des cellules étudiées.

De précédents travaux ont établi que les phospholipides membranaires tels que le phosphatidyl inositol-4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) est un régulateur potentiel des canaux K<sub>ATP</sub>. Baukrowitz et *al.* (2001) ont testé les effets des phospholipides sur les propriétés pharmacologiques des canaux K<sub>ATP</sub>. Ils ont montré que l'application de phosphatidyl inositol (PIPs) réduisait la variabilité de sensibilité à l'ATP. Les PIPs semblent agir via la sous-unité Kir6.2 car une mutation dans Kir6.2 (R176A) atténue simultanément les effets du PIP<sub>2</sub> sur l'inhibition de l'ATP et du glibenclamide. Ces lipides ayant une charge globale négative, il est possible d'envisager une fonction analogue au poly-glutamate présent sur la sous-unité SUR.

On sait par ailleurs (Tucker et *al.*, 1997), qu'il existe trois sites d'action de l'ATP. Le site inhibiteur est localisé sur Kir6.2 et ne nécessite pas de magnésium, tandis que les deux NBD (Nucleotide Binding Domain) de SUR activent le canal en présence de Mg-ATP ou de Mg-ADP en faible concentration. Les glutamates sont des acides aminés reconnus pour leur potentialité à lier les ions divalents. Leur rôle pourrait être celui de chélateur de Mg<sup>2+</sup> afin d'optimiser la régulation du canal par la sous-unité SUR.

## **4.2 Caractéristiques pharmacologiques des canaux mutants**

En ce qui concerne le glibenclamide, les données actuelles correspondent à ce que l'on retrouve pour le type sauvage. Mais il aurait été préférable de tester son effet sur les mutants en absence d'ATP et éventuellement de mesurer des cinétiques d'inactivation afin de se rendre compte d'une réelle identité avec le type sauvage.

En ce qui concerne les ouvreurs (diazoxide, SR47063 et P1075), leur action, se distingue, comme énoncé plus haut, de la mutation et de l'isoforme considérées. Globalement, la mutation de trois résidus sur quinze n'est pas suffisante pour observer un réel effet. Cependant les constructions porteuses de 6 mutations semblent plus affectées : elles ont perdu une grosse partie de leur sensibilité aux ouvreurs. Alors que la perfusion de ces molécules permet une activation souvent plus importante que celle mesurée en absence d'ATP, ces constructions présentent une activation moitié moindre.

## **4.3 Sensibilité à l'ADP**

L'ADP ne semble pas activer les canaux mutants au même titre que les canaux sauvages. Mais l'action de l'ADP est complexe puisqu'il active les canaux via les domaines de liaisons des nucléotides de SUR et, en concentration trop importante, il est inhibiteur. En effet, il entre en compétition avec l'ATP au niveau du site inhibiteur de Kir6.2.

De plus, nous étions, au moment des manipulations, en présence de canaux relativement peu sensibles à l'ATP : les constantes  $K_{1/2}$  mesurées au cours de ces travaux sont de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{M}$  alors que le laboratoire l'avait précédemment établi aux alentours de la dizaine de  $\mu\text{M}$ . Il est donc, compte tenu des données actuelles, difficile de conclure sur la sensibilité à l'ADP de nos constructions.

## **5 Perspectives**

Les données, tant quantitatives que qualitatives, permettent de supposer qu'il existe une interaction entre le poly-glutamate de la sous-unité régulatrice SUR des canaux  $K_{\text{ATP}}$  et des protéines cytosoliques. La région poly-glutamate pourrait être neutralisée par des résidus chargés positivement ou même par des protons.

Ces interactions avec d'autres composants cytosoliques, comme le cytosquelette, sont difficiles à quantifier par patch-clamp et peuvent être absentes dans un système d'expression hétérologue tel que l'ovocyte de Xénope. Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux sur d'autres types cellulaires tels que des lignées de cellules de mammifères et en employant des méthodes plus appropriées à la quantification des interactions protéine-protéine.

On pourrait aussi envisager de modifier un plus grand nombre de glutamates tout en conservant l'idée de les substituer par des glycines (acide aminé le plus simple donc le plus neutre) et des lysines (acide aminé chargé positivement et relativement encombrant).

Il serait intéressant de travailler avec des canaux  $K_{\text{ATP}}$  dont la sous-unité Kir6.2 est rendue insensible à l'inhibition de l'ATP. Ceci permettrait d'observer les effets des nucléotides exclusivement sur la sous-unité SUR.

Et puis, les travaux d'Eric (actuellement en post-doc au laboratoire) suggèrent qu'en absence d'ATP mais en présence d'ADP l'effet du glibenclamide est irréversible. Il serait intéressant de voir si cela s'applique aussi aux mutants.

Enfin, d'autres hypothèses peuvent être émises quant à l'utilité d'un tel enchaînement de charges négatives dans la structure primaire de la protéine SUR. D'autant plus que cet enchaînement n'apparaît pas chez les autres protéines ABC. Ainsi, les bases de l'association de SUR et de Kir6.2 sont encore mal connues. On peut supposer qu'elle met en jeu des interactions électrostatiques, d'autant plus que la sous-unité Kir6.2 du canal

K<sub>ATP</sub> présente une succession d'acides aminés chargés positivement, quoique plus dispersés que les glutamates du polyE de SUR.





*Interdépendance des domaines  
de liaison des nucléotides*



## 1 *Position du problème*

Contrairement à la grande majorité des transporteurs ABC procaryotes chez qui les NBD sont des homodimères, SUR et les autres membres de la sous-famille ABCC présentent une asymétrie dans leur NBD qui se traduit par des activités enzymatiques différentes. Par comparaison avec les autres ATPases homodimériques, il semblerait que le site canonique de SUR soit celui formé par la séquence signature du NBD1 et les motifs A et B de *Walker* du NBD2. Ainsi, les séquences signature, -FSQGQ- et -FSVGQ-, du NBD2 de SUR1 et de SUR2A respectivement, diffèrent du motif canonique -LSGGQ- du NBD1 ; cette observation peut être étendue à toutes les protéines de la famille ABCC où seule la sérine et la seconde glycine sont conservées. De plus, le glutamate supposé être le site catalytique à la fin du motif B de *Walker* est substitué par un aspartate dans le NBD1 des protéines SUR et MRP, et par une sérine chez CFTR. Enfin, la tyrosine supposée lier l'adénine est substituée par un tryptophane dans le NBD1 des protéines ABCC.

SUR1 a été la première protéine ABC présentée comme ayant une asymétrie dans son interaction avec l'ATP. En 1997, Ueda *et al.* ont introduit des mutations au niveau des motifs A et B de *Walker* de chaque NBD de SUR1 et ont examiné la liaison de l'ATP ou de l'ADP aux NBD ainsi que la compétition avec le Mg-ADP. SUR1 lie l' $\alpha$ - ou le  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]8-azido-ATP en présence ou en absence de Mg<sup>2+</sup> ou de vanadate ; une diminution de température piège les nucléotides liés dans une conformation stable qui consiste en la dimérisation des NBD observée chez d'autres protéines ABC. Les mutations du NBD1 empêchent la liaison de l'ATP, pas celles du NBD2. Le Mg-ADP s'oppose à la liaison de l'ATP, et cet effet est réduit en présence des mutants du NBD2. Une autre étude (Ueda *et al.*, 1999) suggère que SUR1 lie fortement le 8-azido-ATP au NBD1 et que le Mg-ADP, soit par liaison directe, soit par hydrolyse du Mg-ATP, se lie au NBD2 et stabilise la liaison du 8-azido-ATP au NBD1. MRP1 présente aussi cette distinction : l'ATP se fixe au NBD1 alors que l'ADP, produit de l'hydrolyse de l'ATP, se lie plutôt au NBD2 et cette capture de l'ADP par le NBD2 favorise la fixation de l'ATP au NBD1 (Gao *et al.*, 2000 ; Hou *et al.*, 2000 ; Nagata *et al.*, 2000). CFTR présente des propriétés similaires avec une interaction des nucléotides stable au NBD1, alors que le NBD2 est un site de rapide turn-over (Szabo *et al.*, 1999 ; Aleksandrov *et al.*, 2001, 2002).

Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation et de marquage par photoaffinité montrent que le NBD2 de SUR présente une faible activité ATPase, propriété essentielle

pour l'ouverture du canal  $K_{ATP}$ , alors que celle du NBD1 est quasi nulle (Matsuo *et al.*, 2000). Bienengraeber *et al.*, (2000), ont montré que l'activité ATPase du NBD2 régule la sensibilité du canal à l'ATP et que la liaison d'ouvreur induit cette activité. Il semble qu'une interaction coopérative entre les NBD, plutôt qu'une contribution indépendante de chaque NBD, soit critique pour la régulation des canaux  $K_{ATP}$  (Zingman *et al.*, 2002).

Afin de répondre plus précisément à la question de l'interdépendance des domaines de liaison des nucléotides et à leur rôle au sein de la protéine, nous avons créé des protéines SUR2A hybrides possédant des NBD identiques (NBD1-NBD1 et NBD2-NBD2) ou inversés (NBD2-NBD1) et testé leur expression membranaire et leur fonctionnalité par les techniques de Western blot, chimiluminescence, patch-clamp et double électrode. Nous avons également construit deux protéines SUR2A mutantes. L'une incorpore la signature ABC canonique du NBD1 au niveau du NBD2 : SUR2A(F1445L,V1447G), l'autre contient une mutation du glutamate du NBD2 censé être responsable de l'hydrolyse de l'ATP : SUR2A(E1470D).

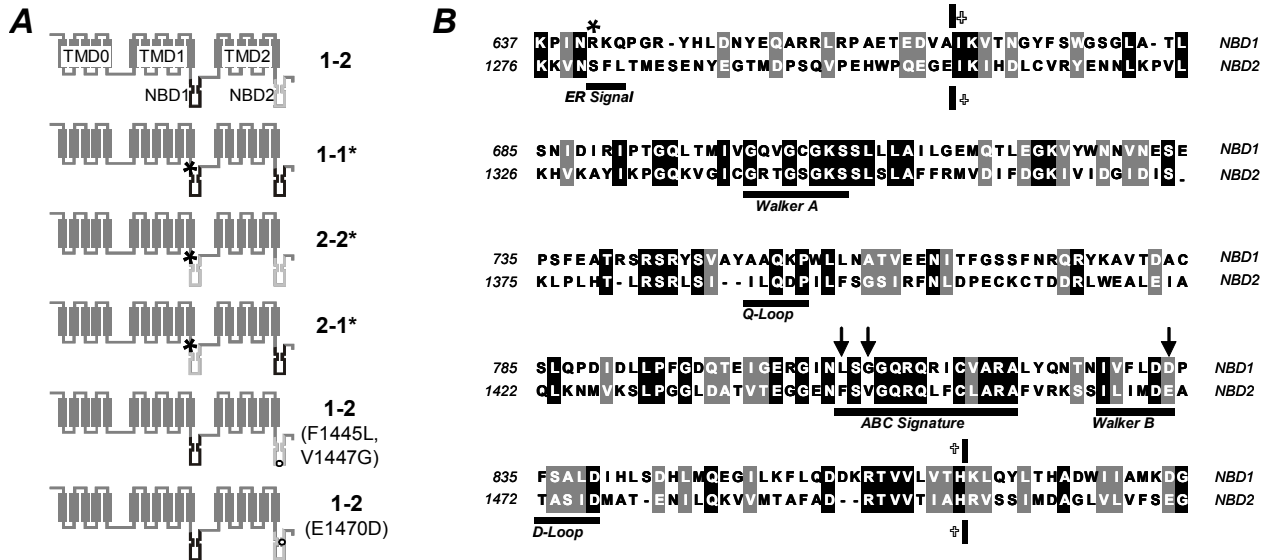
## **2 Résultats**

### **2.1 Topologie des protéines SUR2A hybrides et mutantes**

Afin de déterminer le rôle de chacun des domaines de liaison des nucléotides nous avons construit des protéines SUR2A hybrides possédant des NBD dupliqués (SUR2A NBD1-NBD1 et SUR2A NBD2-NBD2) ou inversés (SUR2A NBD2-NBD1) (**Figure 57 A**). Pour simplifier le texte et les figures ces protéines seront respectivement appelées 1-1, 2-2 et 2-1. Le canal sauvage sera appelé 1-2 et le canal tronqué (en absence de la sous-unité SUR régulatrice) Kir6.2 $\Delta$ C36 (Tucker *et al.*, 1997). Sont également représentées les deux protéines SUR2A mutantes [1-2(F1445L,V1447G) et 1-2(E1470D)].

L'alignement des deux NBD de la protéine SUR2A de Rat (NBD1, positions 637-884 ; NBD2, positions 1276-1518) indique qu'ils ont 24 % de résidus identiques et 43 % de résidus homologues (**Figure 57 B**). Les motifs A et B de *Walker* sont conformes aux séquences consensus (GX<sub>4</sub>GKS/T pour le *Walker* A et Hyd<sub>4</sub>DEX<sub>5</sub>D pour le *Walker* B où X désigne n'importe quel résidu et Hyd un résidu hydrophobe) excepté pour le E du *Walker* B du NBD1 qui est substitué en D. La séquence signature du NBD2 (FSVGQ) diverge de la séquence consensus (LSGGQ).

Les coupures des NBD ont été choisies de façon à englober ces régions (*Walker A*, *Walker B* et séquence signature) et dans des zones où l'alignement est correct (on s'est affranchi des extrémités N- et C-terminales trop divergentes).



**Figure 57 : Modifications des domaines de liaison des nucléotides et mutation du signal de rétention pour augmenter la densité de canaux  $K_{ATP}$  hybrides à la membrane plasmique.**

(A) Représentation schématique des protéines SUR2A hybrides et mutantes et nomenclature utilisée au cours de cette étude. Les trois domaines transmembranaires (TMD) et les deux domaines de liaison des nucléotides (NBD) sont indiqués. L'astérisque représente la mutation du signal de rétention au réticulum endoplasmique, les cercles les mutations introduites.

(B) Alignement peptidique des domaines de liaison des nucléotides 1 et 2 de la protéine SUR2A. Les résidus identiques et homologues sont représentés respectivement sur fond noir et sur fond gris. Les régions conservées (*Walker A*, *Q-loop*, *ABC signature*, *Walker B* et *D-loop*) sont indiquées. Les coupures des NBD représentées par des croix, comportent toutes ces régions. Le résidu R641, marqué par un astérisque, a été muté en Q pour augmenter l'adressage membranaire des constructions. Les flèches indiquent les résidus du NBD2 mutés pour correspondre aux résidus du NBD1. (La numérotation fait référence à la protéine SUR2A de Rat).

## 2.2 Expression des canaux hybrides

Les canaux sauvages, hybrides et tronqués, sont exprimés dans l'ovocyte de Xénope et testés fonctionnellement par la technique du patch-clamp en configuration excisée inside-out. La difficulté a résidé dans la très faible expression des protéines hybrides à la membrane plasmique. Seule la protéine hybride 1-1 semblait former des canaux  $K_{ATP}$ , les

autres protéines hybrides ne permettaient pas d'enregistrer de courant potassique sensible à l'ATP. Nous avons donc muté le signal de rétention au réticulum endoplasmique des protéines SUR2A hybrides afin d'augmenter leur adressage à la membrane (Zerangue *et al.*, 1999). Cette modification a permis d'augmenter d'un facteur 5 la densité de canaux hybrides 1-1 (**Figure 58 A**). Ainsi, tous les résultats de patch-clamp concernent ces protéines hybrides dépourvues de leur signal de rétention au réticulum endoplasmique (**Figure 57**). Cependant ces protéines forment bien moins de canaux fonctionnels à la membrane que les canaux sauvages (en moyenne 500 fois moins) exception faite de la protéine hybride 2-1\* qui s'exprime, d'après le graphique, aussi bien en présence de Kir6.2 qu'un canal tronqué Kir6.2 $\Delta$ C36 (**Figure 58 A**). Cependant nous n'avons pas comptabilisé le nombre de patch où aucun courant n'était détectable.

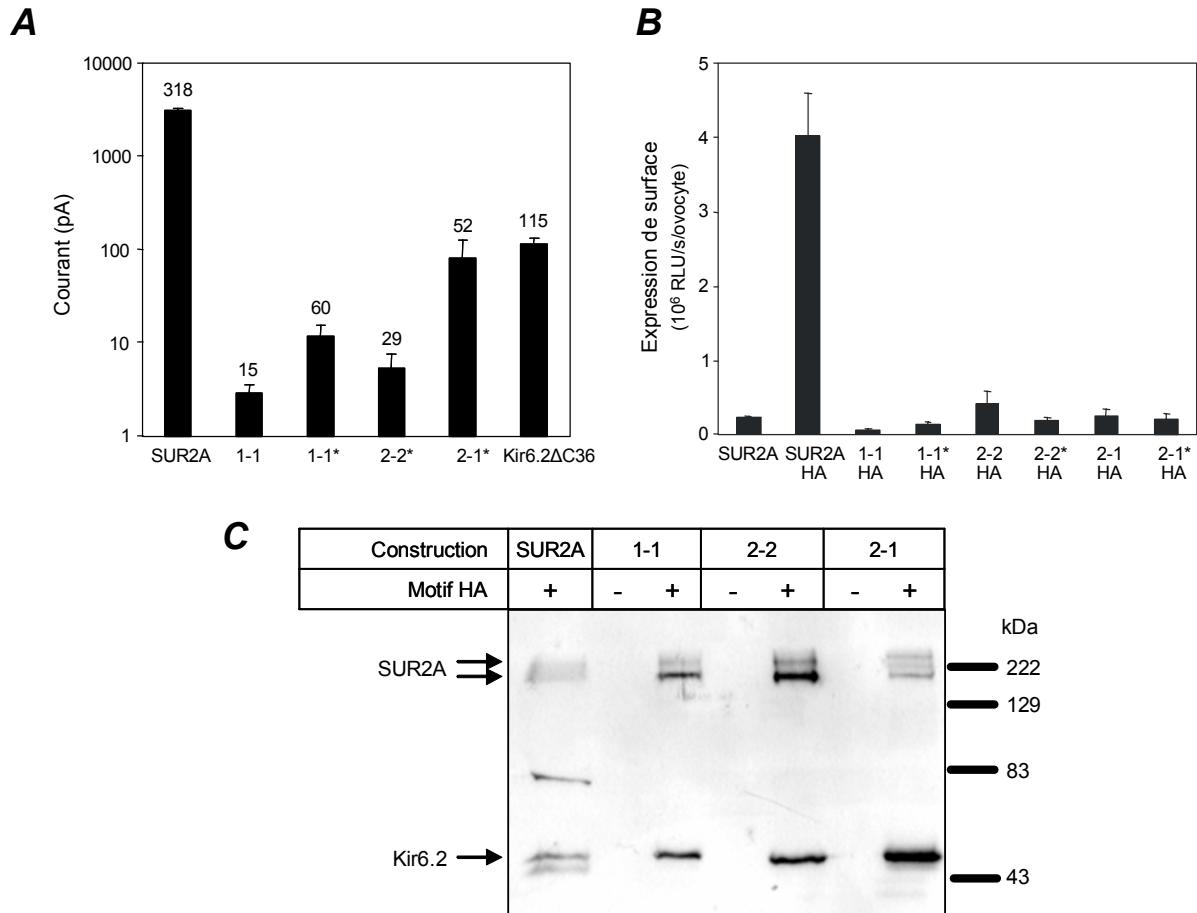
Pour expliquer cette observation, trois hypothèses ont été émises :

- Perte de fonctionnalité du canal
- Problème de production des protéines hybrides
- Problème d'adressage membranaire

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la production de ces protéines. La détection par Western blot, à l'aide d'un marquage extracellulaire des deux sous-unités par un épitope HA (Hémagglutinine A), confirme que les protéines hybrides sont bien produites lorsqu'on les co-exprime avec Kir6.2 dans l'ovocyte de Xénope (**Figure 58 C**). La bande supérieure que l'on observe pour SUR2A permet de penser que les protéines sont glycosylées et quittent donc le réticulum endoplasmique. En revanche, ce test n'est que qualitatif puisque nous n'avons pas mesuré la quantité de protéines déposées sur le gel d'acrylamide. Par ailleurs, il semble qu'au cours de la préparation de nos membranes, l'échantillon contrôle ait été partiellement dégradé, ce qui pourrait expliquer les bandes que l'on observe à 80 kDa ou sous la bande correspondant à Kir6.2.

Dans le même temps, afin de répondre à la question du problème d'adressage membranaire, nous avons testé l'expression de surface des protéines hybrides grâce à la technique de chimiluminescence et le marquage de nos protéines par ce même épitope HA. Le diagramme de la **Figure 58 B** montre que la densité de surface des protéines hybrides, même lorsque le signal de rétention est éliminé, est très réduite et que le complexe octamérique (formé par les deux sous-unités) n'atteint pas ou très difficilement la membrane plasmique. L'émission de lumière mesurée pour les protéines hybrides correspond au bruit de fond que l'on détecte pour la protéine contrôle non marquée.

Ainsi, bien que les protéines hybrides soient bien produites et même glycosylées, leur faible expression de surface associée aux faibles courants mesurés confirment l'hypothèse que ces dernières atteignent difficilement la membrane plasmique ou bien que leur turn-over est très rapide (Crane et Aguilar-Bryan, 2004).



**Figure 58 : Les canaux  $K_{ATP}$  hybrides atteignent difficilement la membrane plasmique**

(A) Densité moyenne de canaux actifs représentés par le courant total mesuré en absence d'ATP après excision du patch (\* sans signal de rétention). Les nombres au-dessus des barres représentent la quantité de patch pris en compte.

(B) Densité de canaux à la membrane plasmique avec ou sans (\*) signal de rétention mesurée par chimiluminescence.

(C) Western-blot des protéines SUR2A sauvage et hybrides par détection d'un épitope HA.

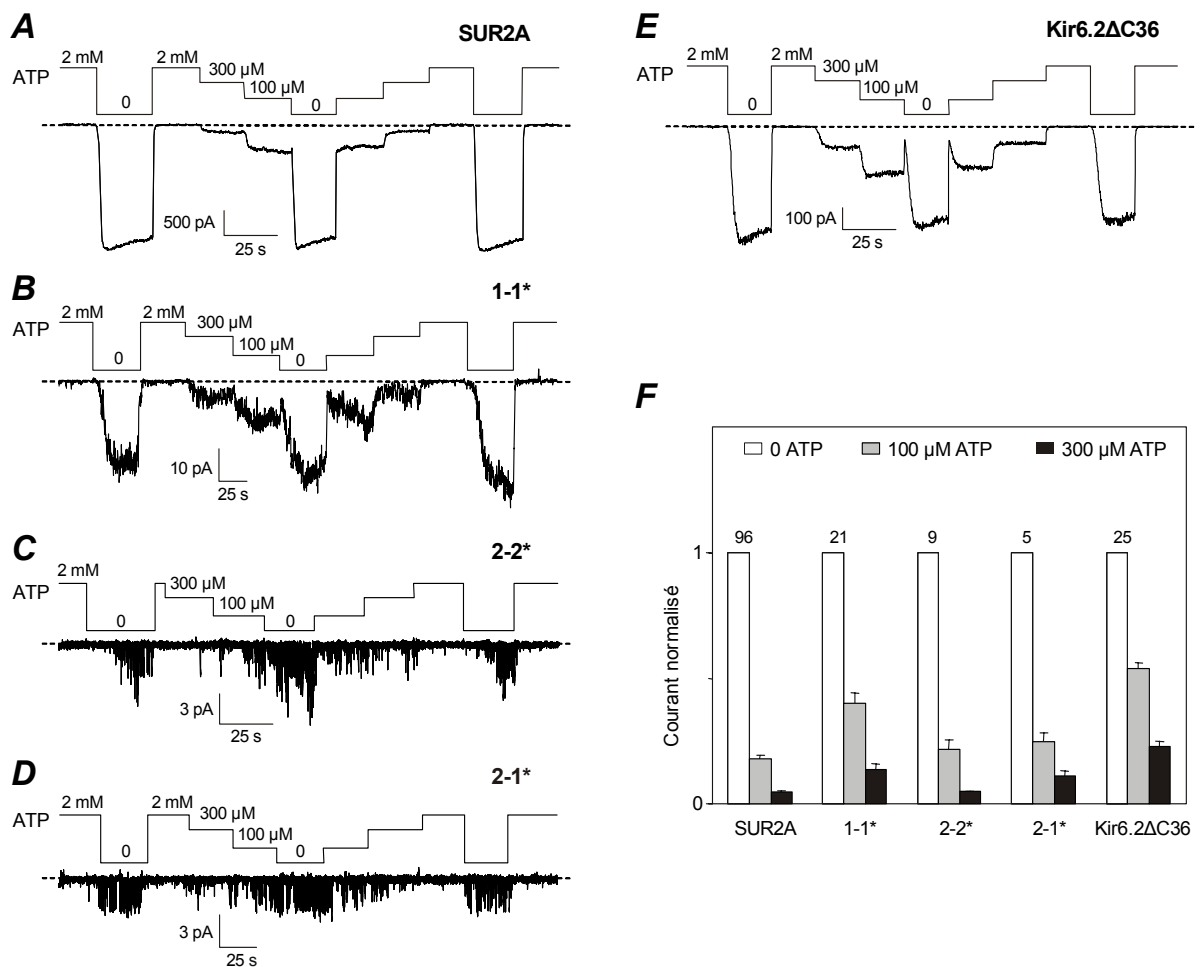


## 2.3 Régulation des canaux hybrides par les nucléotides

Etant donné que les NBD de SUR modulent l'activité du canal Kir6.2, nous avons voulu tester la sensibilité des canaux hybrides aux nucléotides ATP et ADP.

### 2.3.1 Sensibilité à l'ATP

La **Figure 59** présente des exemples de traces de patch obtenues pour les protéines hybrides lorsqu'on les co-exprime avec Kir6.2 et que l'on perfuse différentes concentrations d'ATP. Seule la construction 1-1\* semble avoir une sensibilité à l'ATP plus réduite que celle du type sauvage. Cependant, l'activité des deux NBD1 est toujours présente étant donné que le canal hybride est plus sensible à l'ATP que le canal Kir6.2 $\Delta$ C36 dépourvu de la sous-unité SUR. Les deux autres constructions (2-2\* et 2-1\*) répondent comme la protéine sauvage SUR2A.



**Figure 59 : Exemples de réponses de canaux  $K_{ATP}$  hybrides à l'ATP**

*Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de Xénope par co-injection d'ARN codant pour*

les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique du patch-clamp en configuration patch excisé inside-out en présence de 150 mM  $K^+$  symétrique à un potentiel de  $-50$  mV.

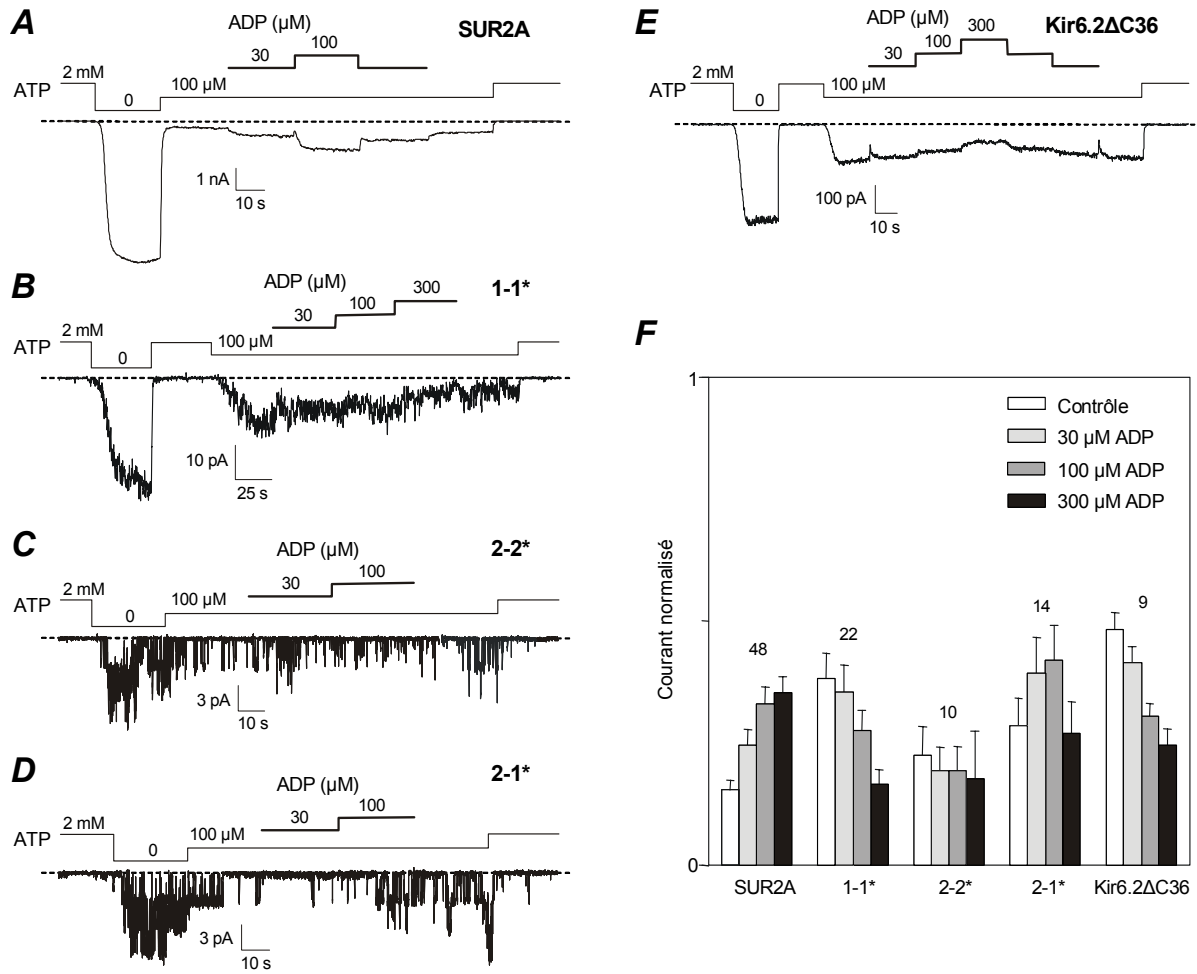
(A-E) L'ATP (0, 100 et 300  $\mu$ M) est appliqué sur la face interne. Avant et après application, des mesures en présence d'une concentration totalement inhibitrice d'ATP (2 mM) et en absence d'ATP définissent les limites inférieures (courant minimum car canaux entièrement fermés) et supérieures (canaux maximalement ouverts) du signal.

(F) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction aux concentrations d'ATP indiquées. Ces valeurs sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP. Les chiffres donnent le nombre de patch pris en compte pour chaque construction.

### 2.3.2 Sensibilité à l'ADP

La **Figure 60** présente des exemples de traces de patch obtenues pour les protéines hybrides lorsqu'on les co-exprime avec Kir6.2 et que l'on perfuse différentes concentrations d'ADP en présence de 100  $\mu$ M d'ATP. Les canaux hybrides possédant des NBD identiques (1-1\* et 2-2\*) ne sont plus activés par l'ADP. Les canaux 1-1\* se comportent comme Kir6.2 $\Delta$ C36 : ils sont d'autant plus inhibés que les concentrations en ADP augmentent. En revanche, compte tenu des barres d'erreurs il est plus difficile de conclure sur un quelconque effet de l'ADP sur les canaux 2-2\*, quelles que soient les concentrations perfusées.

Au contraire la réponse à l'ADP de la construction aux NBD inversés, 2-1\*, est semblable à celle d'un canal sauvage SUR2A.



**Figure 60 : Exemples de réponses de canaux  $K_{ATP}$  hybrides à l'ADP**

Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de Xénope par co-injection d'ARN codant pour les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique du patch-clamp en configuration patch excisé inside-out en présence de 150 mM  $K^+$  symétrique à un potentiel de  $-50$  mV.

(A-E) L'ADP (30, 100 et 300  $\mu$ M) est appliqué sur la face interne. Avant et après application, des mesures en présence d'une concentration totalement inhibitrice d'ATP (2 mM) et en absence d'ATP définissent les limites inférieures (courant minimum car canaux entièrement fermés) et supérieures (canaux maximale-ment ouverts) du signal.

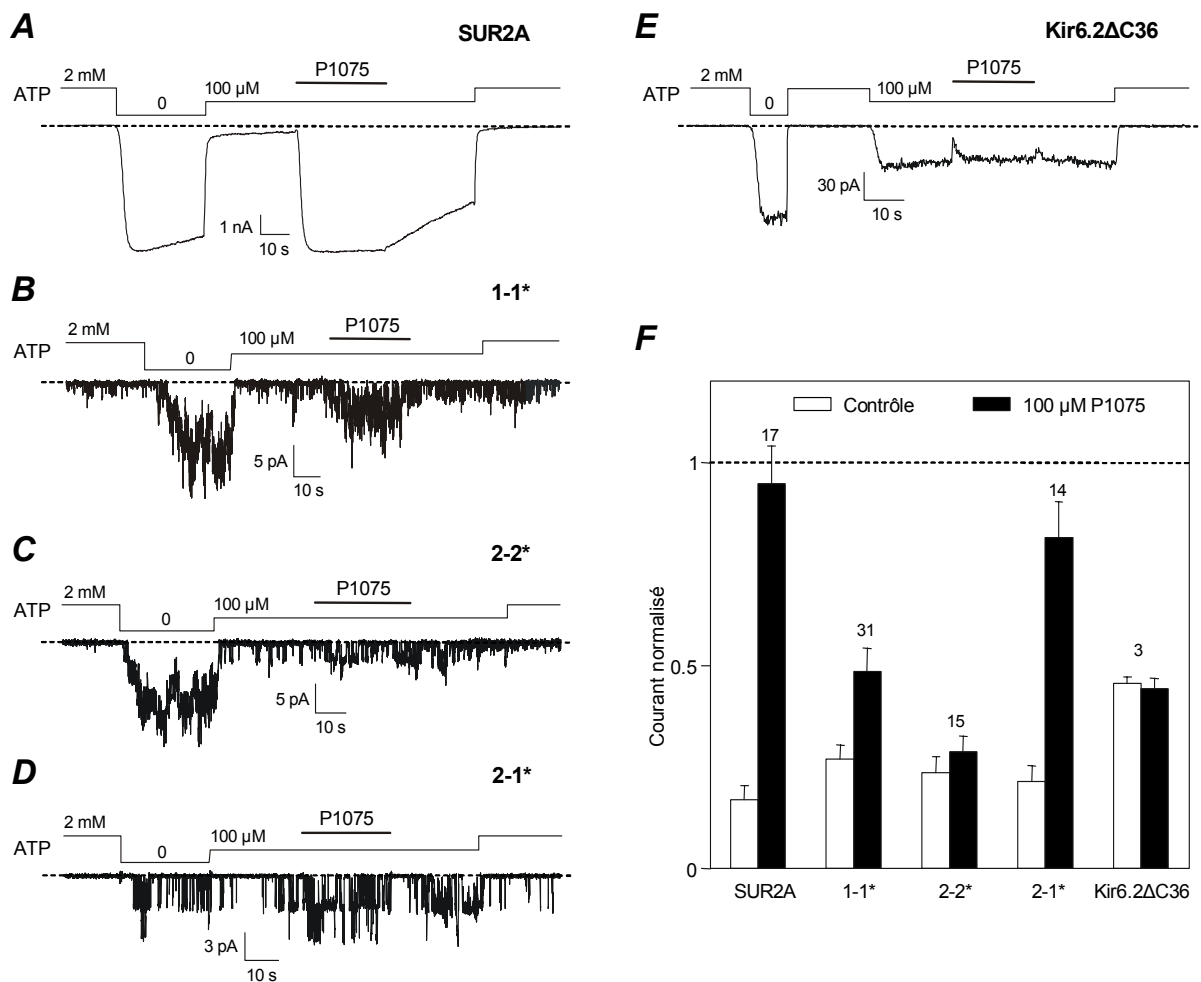
(F) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction aux concentrations d'ADP indiquées. Ces valeurs sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP. Les chiffres donnent le nombre de patch pris en compte pour chaque construction.

## 2.4 Régulation pharmacologique des canaux hybrides

SUR est également la cible des ouvreurs potassiques. Bienengraeber *et al.*, (2000), ont montré que l'activité ATPase du NBD2 régule la sensibilité du canal à l'ATP et que la liaison de l'ouvreur induit cette activité. Nous avons donc testé l'effet du P1075 (**Figure 61**) et du SR47063 (**Figure 62**) sur les canaux hybrides.

La protéine hybride 2-1\* est sensible aux ouvreurs pharmacologiques, et de façon plus surprenante la protéine 1-1\* l'est également. La protéine 2-2\* n'est quant à elle plus activée ni par le P1075, ni par le SR47063.

De plus, que se soit pour la protéine sauvage ou pour la protéine hybride 2-1\*, l'effet de l'activateur est difficilement réversible alors que sa dissociation est rapide pour la protéine hybride 1-1\*. Cette observation conduit à penser qu'il existe deux états conformationnels de la protéine SUR, l'un de forte affinité pour les ouvreurs potassiques, l'autre de faible affinité.

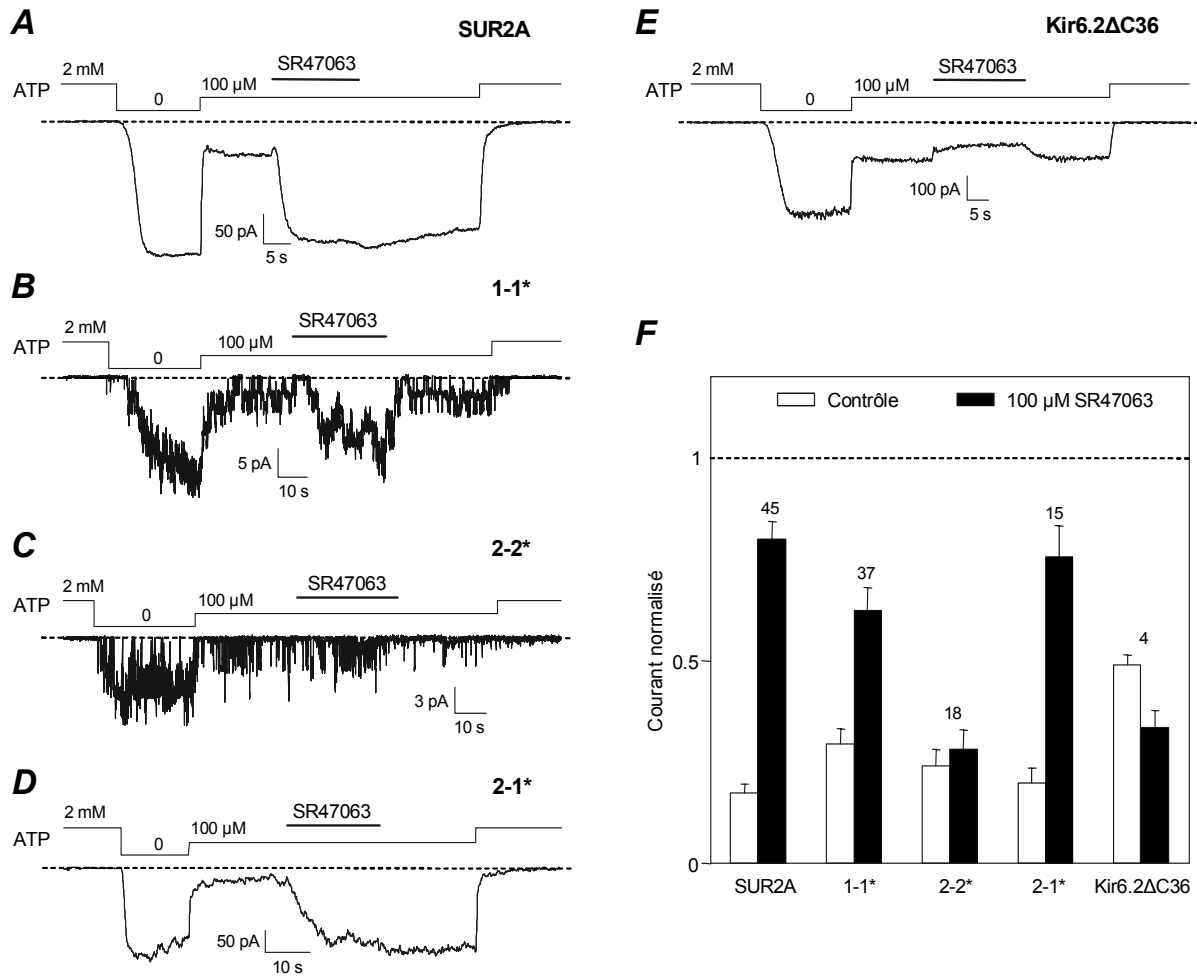


**Figure 61 : Réponses des canaux  $K_{ATP}$  hybrides au P1075**

Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de *Xénope* par co-injection d'ARN codant pour les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique du patch-clamp en configuration patch excisé inside-out en présence de 150 mM  $K^+$  symétrique à un potentiel de  $-50$  mV.

(A-E) Le P1075 (100  $\mu$ M) est appliqué sur la face interne en présence d'une concentration partiellement inhibitrice d'ATP (100  $\mu$ M). Avant et après application, des mesures en présence d'une concentration totalement inhibitrice d'ATP (2 mM) et en absence d'ATP définissent les limites inférieures (courant minimum car canaux entièrement fermés) et supérieures (canaux maximalement ouverts) du signal.

(F) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction. Les barres blanches représentent l'activité moyenne des canaux avant application du P1075. Les barres noires représentent l'activité moyenne en présence de P1075. Ces valeurs mesurées en présence de 100  $\mu$ M ATP sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP. Les chiffres donnent le nombre de patch pris en compte pour chaque construction.



**Figure 62 : Réponses des canaux  $K_{ATP}$  hybrides au SR47063**

Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de *Xénope* par co-injection d'ARN codant pour les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique du patch-clamp en configuration patch excisé inside-out en présence de 150 mM  $K^+$  symétrique à un potentiel de  $-50$  mV.

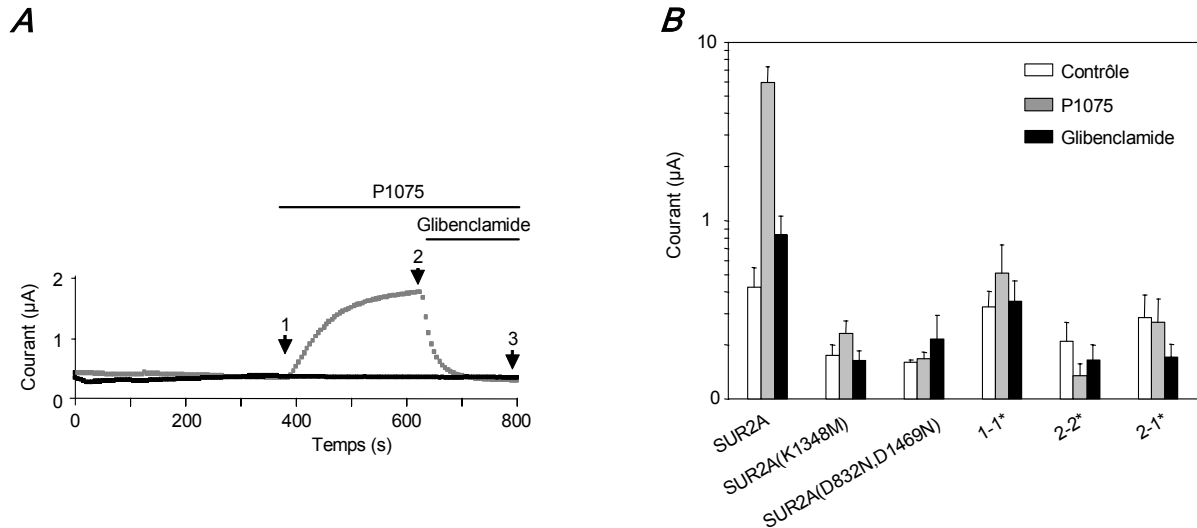
(A-E) Le SR47063 (100  $\mu$ M) est appliqué sur la face interne en présence d'une concentration partiellement inhibitrice d'ATP (100  $\mu$ M). Avant et après application, des mesures en présence d'une concentration totalement inhibitrice d'ATP (2 mM) et en absence d'ATP définissent les limites inférieures (courant minimum car canaux entièrement fermés) et supérieures (canaux maximale-ment ouverts) du signal.

(F) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction. Les barres blanches représentent l'activité moyenne des canaux avant application du SR47063. Les barres noires représentent l'activité moyenne en présence de SR47063. Ces valeurs mesurées en présence de 100  $\mu$ M ATP sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP. Les chiffres donnent le nombre de patch pris en compte pour chaque construction.

## 2.5 Propriétés métaboliques des canaux hybrides

Pour tester si la duplication ou l'inversion des NBD au sein de la protéine SUR a un effet sur les propriétés métaboliques du canal  $K_{ATP}$ , nous avons enregistré les courants macroscopiques à l'aide de la technique du double-électrode sur l'ovocyte de Xénope. Les courants sont mesurés après 15 min d'incubation dans l'oligomycine (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) et l'azide (3 mM). La **Figure 63 A** représente le courant mesuré en fonction du temps et des différentes applications d'activateur ou d'inhibiteur des canaux  $K_{ATP}$ . Dans ces conditions le canal sauvage SUR2A ne s'active pas spontanément mais est révélé lors de l'application d'activateurs. Le même protocole ne permet pas de détecter les canaux hybrides. Ces observations sont illustrées par l'histogramme de la **Figure 63 B** qui représente la moyenne des courants mesurés sur des ovocytes exprimant le canal sauvage, les canaux mutants [1-2(K1348M) et 1-2(D832N,D1469N)] ou les canaux hybrides (1-1\*, 2-2\* et 2-1\*).

Tout comme en patch excisé (travaux d'Hélène Jacquet), le canal mutant 1-2(K1348M) (mutation du motif A de *Walker* du NBD2) est sensible au P1075, alors que le double mutant 1-2(D832N,D1469N) (mutations des motifs B de *Walker* des deux NBD) ne l'est pas. En revanche, la protéine hybride 2-1\* n'est pas toujours activée par le P1075, la protéine hybride 1-1\* l'est un peu plus souvent et la protéine 2-2\* pas du tout. En fait, tout se passe comme si les inhibiteurs métaboliques étaient incapables d'activer les canaux hybrides. L'absence de courant en cellule entière peut provenir d'une ou l'autre combinaison de trois facteurs : la faible densité de canaux membranaires, une réponse plus faible à l'inhibition métabolique, ou une sensibilité plus faible à l'activateur.



**Figure 63 : Les canaux  $K_{ATP}$  hybrides sont insensibles à l'inhibition métabolique**

Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de *Xénope* par co-injection d'ARN codant pour les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique de double électrode à un potentiel de +50 mV.

(A) L'ovocyte est au préalable incubé 15 min dans l'oligomycine (1 µg/µl) et l'azide (3 mM). Le DNFB (100 µM) est appliqué après 2 min d'enregistrement. Trois mesures de courant sont alors prises : courant contrôle (1), courant pendant l'application de P1075 (2) et courant après l'inhibition par le glibenclamide (3). La trace grise correspond au canal sauvage, la trace noire au canal hybride 1-1\*.

(B) Moyenne des courants mesurés pour chaque construction à partir de 4 ovocytes au moins.

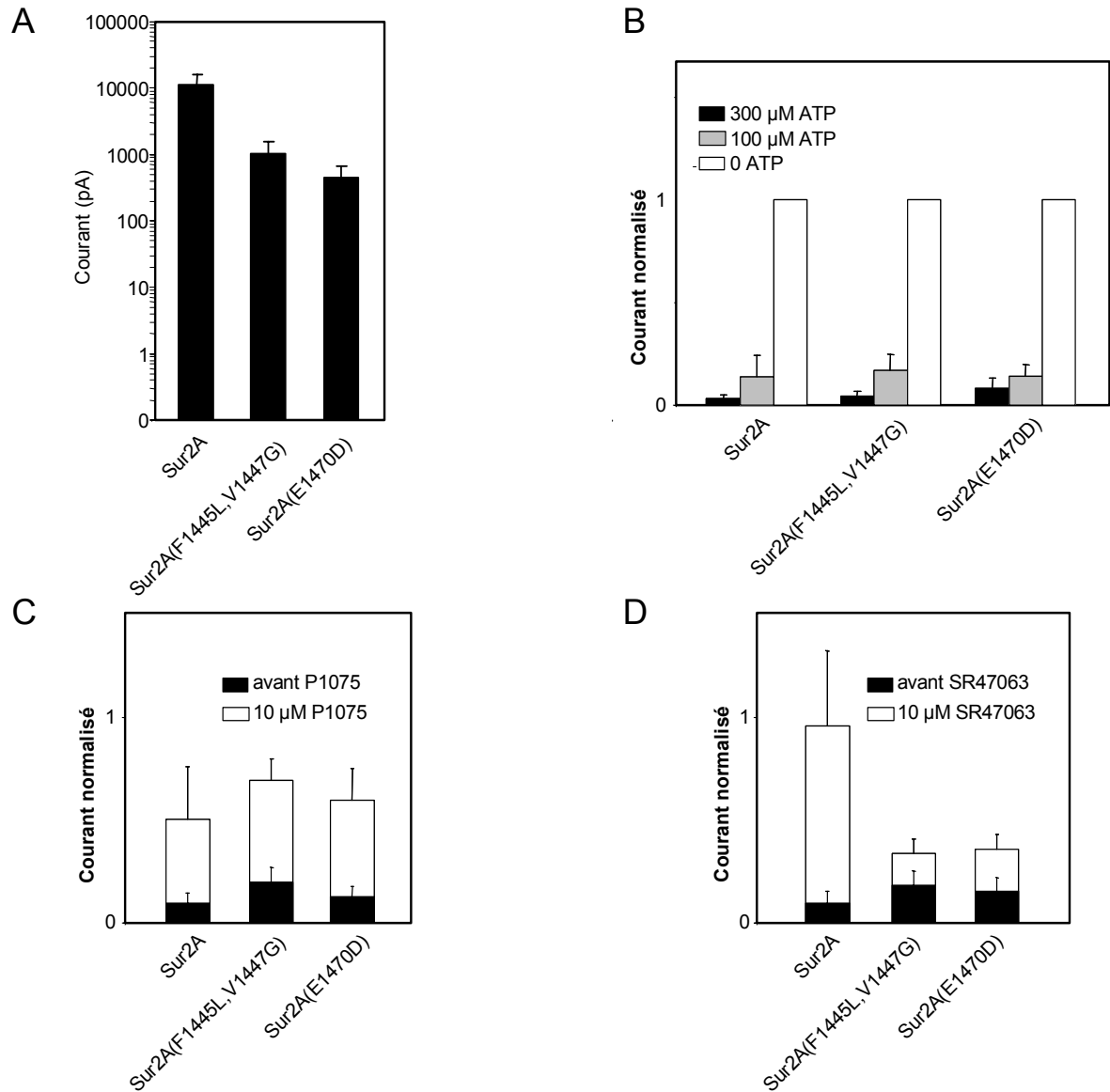
## 2.6 Propriétés pharmacologiques et nucléotidiques des canaux mutants

Afin de mieux comprendre les phénomènes observés lors de la duplication ou de l'inversion des NBD et d'en faciliter l'interprétation, nous avons créé deux protéines SUR2A mutées au niveau du NBD2 dans la séquence signature ABC et dans le glutamate du motif B de *Walker*. A l'origine ces deux mutations étaient destinées à la protéine hybride 2-2 afin de restaurer en partie un génotype sauvage 1-2. Mais nous nous sommes heurtés à différents problèmes de mutagenèse. Ces problèmes, associés à la très difficile expression du canal hybride 2-2, nous ont conduit à nous orienter vers la protéine sauvage SUR2A. Ces deux protéines sont appelées respectivement 1-2(F1445L,V1447G) et 1-2(E1470D) et forment 10 et 20 fois moins de canaux  $K_{ATP}$  que la protéine sauvage (**Figure 64 A**). Cette observation est d'autant moins étonnante que la mutation de ce même



glutamate en lysine au niveau de l'isoforme SUR1 est responsable du PHHI (Aguilar-Bryan et Bryan, 1996).

La sensibilité à l'ATP (**Figure 64 B**) et au P1075 (**Figure 64 C**) des canaux mutants reste identique à celle du canal sauvage, compte tenu des barres d'erreur. En revanche leur sensibilité au SR47063 (**Figure 64 D**) est moindre que celle du canal sauvage. Je m'explique mal ce résultat dans la mesure où le SR47063 et le P1075 semblaient jusqu'alors agir de la même façon sur le canal. Cependant alors que la réponse au P1075 est maximale pour la concentration 10  $\mu$ M (au-delà de cette concentration il y a saturation), elle est maximale pour une plus forte concentration de SR47063, de l'ordre de 100 $\mu$ M. La différence de réponse observée pourrait résider dans leur différence d'affinité. Mais ceci n'explique cependant pas la réponse du type sauvage au SR47063 qui est presque le double de celle mesurée pour le P1075. Tout porte à croire que les mutations introduites déplacent la courbe d'affinité du SR47063 vers des valeurs plus élevées. Un plus grand nombre d'expériences avec des concentrations d'ouvriers différentes (10 et 100 $\mu$ M par exemple) permettrait de lever toute ambiguïté.



**Figure 64 : Exemples de réponses de canaux  $K_{ATP}$  mutants à l'ATP, au P1075 et au SR47063**

Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de *Xénope* par co-injection d'ARN codant pour les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique du patch-clamp en configuration patch excisé inside-out en présence de 150 mM  $K^+$  symétrique à un potentiel de  $-50$  mV. Le nombre de patch pris en compte est au moins de trois.

(A) Densité moyenne de canaux actifs représentés par le courant total mesuré en absence d'ATP après l'excision du patch.

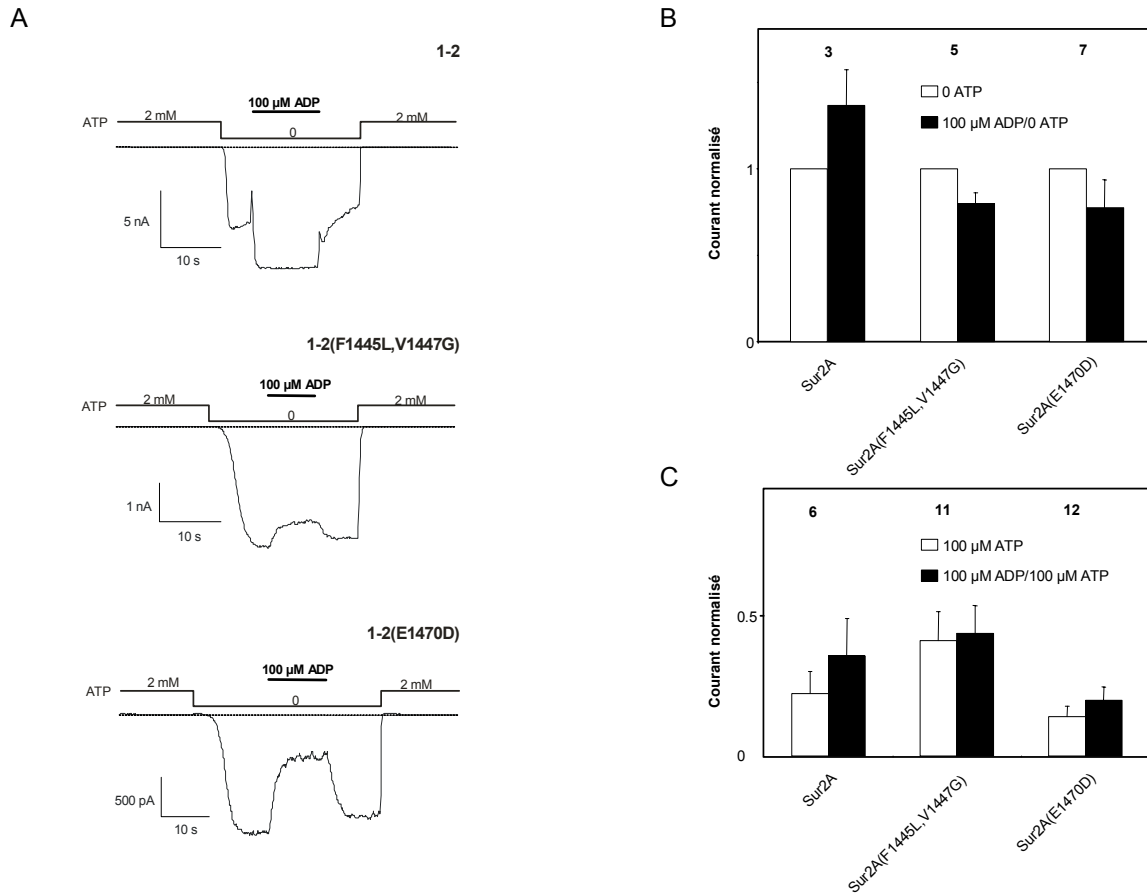
(B) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction aux concentrations d'ATP indiquées. Ces valeurs sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP.

(C) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction. Les

*barres blanches représentent l'activité moyenne des canaux avant application du P1075. Les barres noires représentent l'activité moyenne en présence de 10  $\mu$ M de P1075. Ces valeurs mesurées en présence de 100  $\mu$ M ATP sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP*

*(D) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction. Les barres blanches représentent l'activité moyenne des canaux avant application du SR47063. Les barres noires représentent l'activité moyenne en présence de 10  $\mu$ M de SR47063. Ces valeurs mesurées en présence de 100  $\mu$ M ATP sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP.*

Afin de tester la sensibilité à l'ADP des canaux mutants, nous avons mesuré les courants obtenus lorsque nous perfusions une solution d'ADP en absence d'ATP (**Figure 65 A**). Dans ces conditions les résultats obtenus sont plus reproductibles et permettent de conclure de façon plus franche. Les canaux mutants ne sont plus activés par 100  $\mu$ M d'ADP en absence d'ATP (**Figure 65 B**), ils sont même inhibés par l'ADP. Il est plus difficile de conclure sur une réelle activation des courants lorsque l'effet de l'ADP est testé en présence de 100  $\mu$ M d'ATP (**Figure 65 C**).



**Figure 65 : Exemples de réponses de canaux  $K_{ATP}$  mutants à l'ADP en absence ou en présence d'ATP**

Les canaux sont reconstitués dans des ovocytes de Xénope par co-injection d'ARN codant pour les sous-unités Kir6.2 et SUR2A. Leur activité est mesurée par la technique du patch-clamp en configuration patch excisé inside-out en présence de 150 mM  $K^+$  symétrique à un potentiel de  $-50$  mV. Le nombre de patch pris en compte pour chaque construction est indiqué au dessus des histogrammes.

(A) L'ADP (100  $\mu$ M) est appliqué sur la face interne en absence d'ATP. Avant et après application, des mesures en présence d'une concentration totalement inhibitrice d'ATP (2 mM) et en absence d'ATP définissent les limites inférieures (courant minimum car canaux entièrement fermés) et supérieures (canaux maximale ouverts) du signal.

(B) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction. Les barres blanches représentent le courant mesuré en absence d'ATP. Les barres noires représentent l'activité moyenne en présence de 100  $\mu$ M d'ADP. Ces valeurs sont normalisées par rapport à

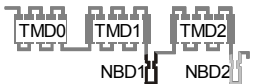





*l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP.*

*(C) Histogramme représentant la moyenne des courants obtenus pour chaque construction. Les barres blanches représentent le courant mesuré en présence de 100  $\mu$ M d'ATP. Les barres noires représentent l'activité moyenne en présence de 100  $\mu$ M d'ADP et de 100  $\mu$ M d'ATP. Ces valeurs sont normalisées par rapport à l'activité maximum enregistrée en absence d'ATP.*

Les propriétés pharmacologiques et nucléotidiques des canaux mutants sont à rapprocher de celles que l'on observe pour la construction 1-1 : perte d'activation par l'ADP mais sensibilité aux ouvreurs potassiques toujours présente.

### **3 Discussion**

La (**Figure 66**) illustre tous les résultats obtenus au cours de cette étude.

Kir6.2 +	Production protéique	Adressage membranaire	Activation par l'ADP	Activation par les ouvreurs
 <b>1-2</b>	+	++	+	++
 <b>1-1</b>	+	-	-	+
 <b>2-2</b>	+	--	0	0
 <b>2-1</b>	+	--	+	++
 <b>1-2</b> (F1445L, V1447G)	+	+	-	+
 <b>1-2</b> (E1470D)	+	+	-	+

**Figure 66 : Tableau récapitulatif de tous les résultats obtenus.**

Toutes les protéines sont bien produites (+). Elles s'adressent plus (+) ou moins (-) bien à la membrane et répondent plus (+) ou moins (-) bien à l'ADP et aux ouvreurs pharmacologiques. (0 signifie qu'il n'y a pas d'effet).

La faible quantité de canaux détectés lorsque les protéines SUR hybrides sont co-exprimées avec Kir6.2 laisse planer un doute quant à l'identité moléculaire de ces canaux : pourrait-il s'agir de Kir6.2 seul ? En effet John *et al.* (1998) ont montré que le système de rétention au réticulum endoplasmique est saturable et que la surexpression de Kir6.2 seul peut donner des canaux fonctionnels à la membrane. Cependant nos résultats démontrent bien la présence de la sous-unité SUR puisque les protéines hybrides 1-1\* et 2-1\* sont encore sensibles aux ouvreurs pharmacologiques. Dans le cas de la protéine hybride 2-2\*, la comparaison des sensibilités à l'ATP et à l'ADP par rapport au canal Kir6.2 $\Delta$ C36 permet de lever toute ambiguïté. Ainsi, nos résultats montrent que les protéines SUR2A possédant des NBD identiques ou inversés parviennent à s'associer à la sous-unité Kir6.2 pour former des canaux K<sub>ATP</sub> fonctionnels bien que leur adressage à la membrane plasmique et leur régulation nucléotidique et pharmacologique soient perturbés.

La liaison et l'hydrolyse des nucléotides sont supposées être la source d'énergie assurant le fonctionnement du transporteur ABC en induisant des changements conformationnels au niveau des NBD et des TMD (Schneider *et al.*, 1998). La non équivalence des NBD a été montrée pour SUR et d'autres transporteurs ABC, mais son impact sur la fonction est incertain. C'est pourquoi nous avons choisi de tester des protéines SUR2A possédant des NBD identiques ou inversés.

De telles méthodes ont déjà été employées chez d'autres protéines ABC. Beaudet et Gros (1995) ont montré que bien que les NBD de la P-gp (glycoprotéine P ou MDR1) soient très similaires, une cellule exprimant une protéine avec deux NBD2 n'est pas viable. Le changement et l'effet de la position des NBD au sein de la protéine CFTR ont également été testés (Pollet *et al.*, 2000). Ils ont construit une série de chimères dans lesquelles ils ont déplacé ou supprimé les NBD et ont regardé leur repliement, leur adressage à la membrane et leur activité de canal chlorure. Leurs chimères possédant des NBD identiques ou inversés étaient mal repliées et retenues dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. TAP a également fait l'objet d'intenses recherches (Daumke *et al.*, 2001 ; Arora *et al.*, 2001). Ces auteurs ont créé différents modèles où ils ont échangé les TMD et/ou les NBD. Les modèles possédant des TMD ou des NBD identiques étaient inactifs. Ils en ont conclu que les deux types de TMD et de NBD étaient nécessaires pour le transport, mais que leur arrangement moléculaire était indifférent. Toutes ces conclusions sont à rapprocher des résultats obtenus avec nos protéines hybrides, à savoir un problème d'adressage membranaire, une perte de fonctionnalité de la protéine en absence de NBD1 et une certaine « symétrie » dans le fonctionnement de la protéine puisque l'inversion des NBD ne semble pas perturber sa capacité à moduler Kir6.2.

La mutation E1507K (Aguilar-Bryan et Bryan, 1996) dans le motif B de *Walker* de l'isoforme SUR1 est responsable de l'hyperinsulinémie hypoglycémique persistante du nourrisson qui se caractérise par une sécrétion d'insuline indépendante du glucose par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette mutation abolit l'activation par le Mg-ADP, soulignant ainsi l'importance de l'activation par l'ADP pour le bon fonctionnement des canaux  $K_{ATP}$  en tant que capteurs métaboliques. Beaucoup de mutations responsables d'hyperinsulinémie congénitale sont localisées au niveau des NBD de SUR1 (Sharma *et al.*, 2000) et leur caractérisation fonctionnelle a permis de les classer en deux groupes : celles qui empêchent le bon adressage à la membrane plasmique et celles qui sont responsables de la perte de sensibilité du canal à l'activateur endogène qu'est le Mg-ADP

(Campbell *et al.*, 2003). Ces observations pour l'isoforme SUR1 pourraient s'appliquer aux résultats que nous avons obtenus pour les protéines SUR2A hybrides possédant deux NBD identiques : les résidus clefs pour le bon repliement et le bon fonctionnement de la protéine se retrouvent au niveau des deux NBD et tout deux sont indispensables pour le bon fonctionnement du canal.

Par ailleurs, les nucléotides liés au magnésium ont des effets différents sur les deux sous-unités composant le canal  $K_{ATP}$ . Ils inhibent Kir6.2 exprimé seul (Drain *et al.*, 1998 ; Zerangue *et al.*, 1999) alors qu'ils activent le canal lorsqu'on co-exprime SUR et Kir6.2. La liaison des nucléotides ne requiert pas des NBD intacts dans la mesure où des mutations dans les motifs A et B de Walker n'affectent pas l' $IC_{50(ATP)}$  (Gribble *et al.*, 1997a ; Shyng *et al.*, 1997b). Au contraire, l'activation du canal requiert des NBD intacts car des mutations dans les motifs A et B de Walker atténuent fortement l'effet du Mg-ADP. Nos résultats confirment ces observations et vont même plus loin : l'intégrité des deux NBD est indispensable pour la bonne réponse du canal au Mg-ADP. Même la mutation, qui pourrait paraître silencieuse, d'un glutamate en aspartate abolit cet effet. En revanche la position des NBD au sein de la protéine ne semble pas être importante pour observer cette activation.

De précédentes études utilisant le  $[^3H]P1075$  suggèrent que les ouvreurs potassiques se lient à une configuration particulière du SUR qui requiert le magnésium et un nucléotide hydrolysable. Les mutations des NBD abolissent fortement la liaison du  $[^3H]P1075$  (Dickinson *et al.*, 1997 ; Hambrock *et al.*, 1998 ; Loffler-Walz et Quast, 1998 ; Schwanstecher *et al.*, 1998). Une récente étude montre que les deux NBD purifiés de SUR2A présentent une faible activité ATPase (Masia *et al.*, 2005). D'autres données suggèrent que l'hydrolyse au NBD2 est nécessaire pour induire un changement de conformation de SUR et ainsi que le canal soit activé (Bienengraeber *et al.*, 2000) et qu'une coopération entre les NBD plutôt qu'une contribution indépendante est critique pour la régulation du canal (Zingman *et al.*, 2002). Ces expériences suggèrent que les ouvreurs potassiques agissent non pas directement mais plutôt en stimulant l'activité ATPase aux NBD favorisant ainsi la conformation post hydrolytique liée au Mg-ADP, conformation associée à un canal ouvert. Ce mécanisme ressemble à celui d'un transport actif où l'ouvreur joue le rôle de substrat. Mais nos résultats démontrent que le NBD2 n'est pas indispensable pour l'activation par les ouvreurs ni même le glutamate ce qui semble indiquer que la liaison et l'action des ouvreurs ne soient pas liées à l'hydrolyse de l'ATP.



En ce qui concerne la mutation de la séquence signature pour la rendre canonique, des travaux sur TAP ont montré que la présence de deux séquences canoniques améliorerait d'un facteur deux le transport de peptide (Chen *et al.*, 2004). Dans le cas de SUR2A il ne semble pas que l'on améliore les performances du canal.

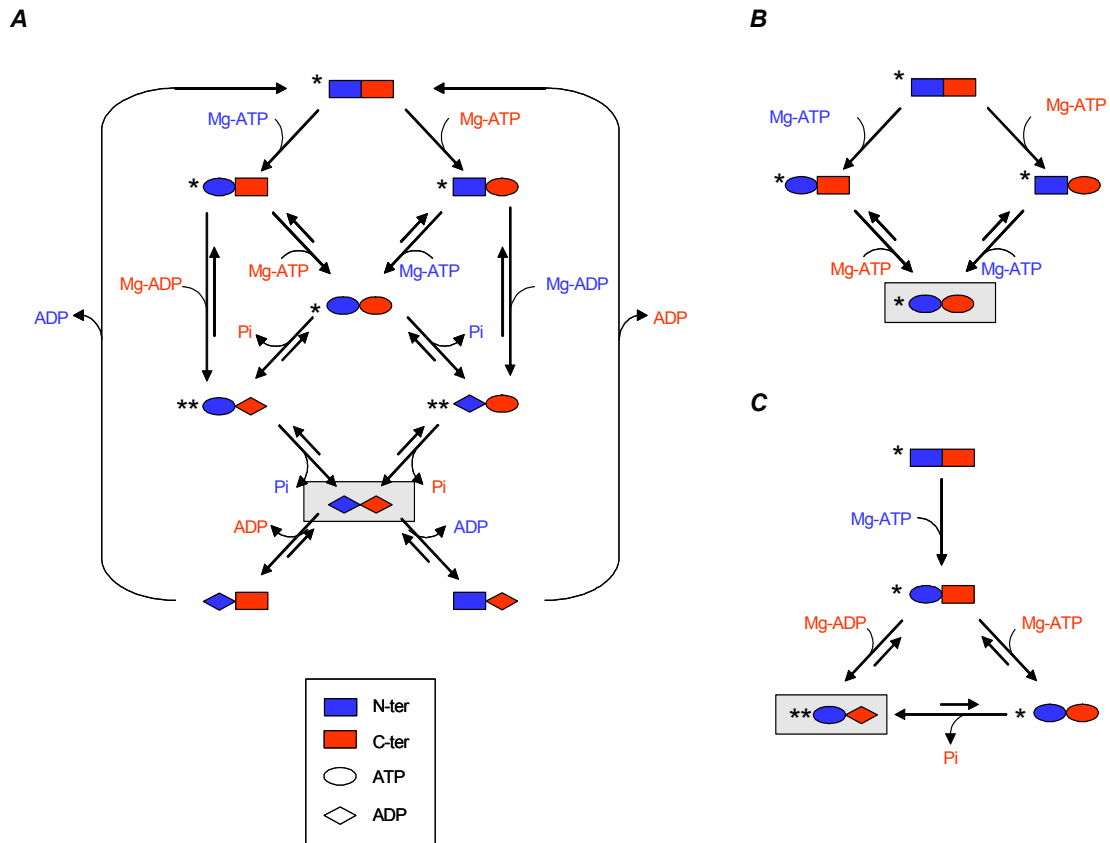
Les recherches actuelles cherchent à comprendre comment les nucléotides liés aux NBD de SUR peuvent influencer l'inhibition par l'ATP de la sous-unité Kir6.2. Un mécanisme possible serait que l'hydrolyse des nucléotides puisse induire un changement de conformation particulier de SUR qui stabilise le canal dans un état ouvert et s'oppose ainsi à l'effet inhibiteur de l'ATP, qui stabilise l'état fermé (Shyng *et al.*, 1997a). Ce mécanisme ressemble à celui proposé pour le canal CFTR, où l'hydrolyse de l'ATP aux NBD produit l'énergie nécessaire pour l'ouverture du canal (Gadsby *et al.*, 1999). Mais il semble que l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP ne soit pas nécessaire pour la fermeture du canal (Aleksandrov *et al.*, 1998). L'énergie viendrait plutôt de l'interaction de CFTR avec le Mg-ATP (Aleksandrov *et al.*, 2000). Il semble même que la liaison de nucléotides non hydrolysables soit suffisante pour l'ouverture du canal. L'hydrolyse permettrait la réversibilité du phénomène en conditions physiologiques. Ceci est en accord avec ce que l'on observe pour le mutant SUR2A(E1470D) qui, en théorie, n'est plus en mesure d'hydrolyser l'ATP.

Nos expériences mettent en évidence le fonctionnement modulaire des transporteurs ABC, ou du moins de la protéine SUR. Les domaines cytoplasmiques peuvent être dupliqués ou échangés tout en conservant une protéine fonctionnelle (association avec Kir6.2 pour former des canaux sélectifs au K<sup>+</sup> et sensibles à l'ATP). Cependant les fonctions régulatrices de la protéine sont dans certains cas modifiées : perte de l'activation par l'ADP dans le cas où l'un des NBD est absent, perte de la sensibilité aux ouvreurs pharmacologiques en absence de NBD1. Par ailleurs il a été montré que les mutations dans les NBD altèrent la spécificité ou l'affinité des ouvreurs (Hambrock *et al.*, 1999 ; Gribble *et al.*, 2000). Le temps de désactivation pharmacologique des canaux présentant des NBD modifiés est plus court (affinité apparente plus faible), en particulier pour la protéine hybride 1-1, ce qui laisse suggérer que la libération de l'ouvreur dépend de l'interaction entre les NBD.

Pour que le récepteur SUR soit fonctionnel, les deux domaines de liaison des nucléotides doivent être différents (NBD1 et NBD2). L'activation par l'ADP requiert un NBD2 complet et fonctionnel, mais également un NBD1. Les ouvreurs n'agissent pas

exactement par le même mécanisme alors que leur site d'action semble commun. Nos données ainsi que les données cristallographiques indiquent qu'il existe un couplage entre les NBD pour l'activation pharmacologique du canal.

Avant de proposer un modèle, il est important de se rappeler qu'en conditions physiologiques les canaux  $K_{ATP}$  sont dans un environnement qui contient plusieurs millimolaires d'ATP contre quelques micromolaires de Mg-ADP. Ces concentrations d'ADP ne sont donc pas suffisantes pour activer le canal. Au delà l'ADP devient inhibiteur en se fixant sur la sous-unité Kir6.2. En ce sens, je rejoins le modèle proposé par Bienengraeber *et al.* (1999) qui se base non pas sur les concentrations intracellulaires d'ATP et d'ADP mais sur des configurations particulières du récepteur des sulfonylurées. Ainsi, ils distinguent l'état inhibiteur Mg-ATP lié de l'état activateur Mg-ADP lié. L'activité ATPase du NBD2 permet la production de Mg-ADP localement à partir de l'ATP et assure ainsi l'activation du canal. Cependant, mon modèle diverge du leur sur différents aspects. Selon moi (i) le Mg-ATP lié au NBD1 joue un rôle structural primordial. Son absence est critique pour l'intégrité du canal (perte d'activation par les ouvreurs et le Mg-ADP) (ii) l'effet des ouvreurs est indépendant de l'hydrolyse de l'ATP au NBD2. La **Figure 67** illustre ce modèle qui est basé sur les résultats que l'on obtient avec les protéines SUR2A hybrides.



**Figure 67 : Modèle de différentes configurations de SUR assurant l'activation du canal.**

Trois fonctionnements du récepteur des sulfonylurées sont possibles :

(A) dans le cas où les NBD sont fonctionnellement équivalents et hydrolysent tous deux l'ATP, la configuration ADP lié aux deux NBD est majoritaire.

(B) dans le cas où les NBD sont fonctionnellement équivalents et n'hydrolysent pas l'ATP, la configuration ATP lié aux deux NBD est majoritaire.

(C) dans le cas où les NBD ne sont pas fonctionnellement équivalents et que seul le NBD2 hydrolyse l'ATP, la configuration ATP lié au NBD1 ADP lié au NBD2 est majoritaire et assure l'activation du canal.

Les configurations majoritaires sont figurées par un rectangle grisé. Toutes les autres configurations ne sont que transitoires. Celles qui autorisent la liaison de l'ouvreur sont marquées d'une astérisque dans le cas d'une liaison de faible affinité et de deux astérisques dans le cas d'une forte affinité.

Nos résultats montrent que l'absence de l'un des NBD est critique pour le bon fonctionnement du canal, ce qui suggère que les deux NBD ne sont pas fonctionnellement équivalents. Le modèle (C) correspond ainsi au fonctionnement de la protéine SUR2A sauvage. La configuration ATP lié au NBD1, ADP lié au NBD2 assure l'activation du canal. La perfusion de Mg-ADP permet de s'affranchir de cette étape d'hydrolyse en se liant directement au NBD2 ou en remplaçant l'ADP

déjà présent. Le Mg-ATP se lie préférentiellement au NBD1 puis sa liaison au NBD2 permet son hydrolyse. De cette hypothèse de fonctionnement on en déduit que le modèle (B) correspond à la protéine possédant deux NBD1 et que le modèle (A) correspond à la protéine possédant deux NBD2. Ainsi l'affinité du NBD1 pour l'ATP est telle que la perfusion de Mg-ADP ne peut remplacer le Mg-ATP déjà lié aux deux NBD1 et inhibe le canal via la sous-unité Kir6.2. La configuration Mg-ADP lié aux deux NBD2 ne permet pas d'être dans la configuration adéquate pour la liaison des ouvreurs. Ceux-ci n'ont donc aucun effet sur la construction 2-2. Enfin, la construction 2-1 est symétrique à la construction sauvage ce qui semble indiquer que les NBD partagent des zones de contact communes avec les TMD et que leur inversion n'est pas critique pour le fonctionnement du canal.



## *Conclusions et perspectives*



Le canal  $K_{ATP}$  a ceci d'intéressant qu'il s'agit de l'association d'un transporteur ABC et d'un canal ionique. C'est donc un bon modèle pour appréhender les relations structure/fonction des transporteurs ABC à l'aide d'une technique particulière : le patch-clamp. Cette technique permet une étude plus aisée des propriétés pharmacologiques et nucléotidiques du canal dans la mesure où elle s'affranchit de toutes les techniques d'amplification et de purification de protéines membranaires lourdes à mettre en œuvre. Cependant, la régulation des canaux  $K_{ATP}$  est complexe et n'est pas encore totalement élucidée. Les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour but d'identifier les structures ainsi que mécanismes impliqués dans le fonctionnement du canal  $K_{ATP}$  au niveau moléculaire.

Deux résultats importants ressortent de cette étude :

- Nous avons identifié un acide aminé, localisé dans la 17<sup>ème</sup> hélice transmembranaire, responsable de la sélectivité aux ouvreurs potassiques SR47063 et P1075 de l'isoforme cardiaque (SUR2A). Nous avons également montré que son environnement en résidus hydrophobes est important pour réaliser des liaisons de  $\pi$ -stacking avec ces molécules qui possèdent toutes un cycle aromatique dans leur formulation chimique. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, qui régissent la spécificité et l'affinité des molécules pharmacologiques pour un tissu donné, facilitera le développement de thérapies plus ciblées.
- Nous avons également montré que les domaines de liaison des nucléotides (NBD) sont interchangeables mais que deux domaines distincts sont indispensables pour un fonctionnement optimal du canal. Nous avons ainsi mis en évidence une coopérativité entre ces deux domaines et proposé un modèle de fonctionnement de la protéine SUR pour l'activation du canal.

Par ailleurs des résultats préliminaires, qu'il reste encore à approfondir, révèlent que la protéine SUR est capable de fixer des métaux lourds intracellulaires tels que le zinc ou le cadmium. Cette fixation induirait un changement de conformation de SUR qui conduirait ainsi à l'ouverture du canal. Dans cette hypothèse SUR se comporterait comme un transporteur bien qu'aucune activité de transport n'ait pu jusqu'alors être mise en évidence chez cette protéine ABC.



Enfin, en observant les alignements de séquences en acides aminés des protéines SUR, nous avons mis en évidence une zone très conservée comprenant une quinzaine de résidus glutamates située entre le domaine NBD1 et la douzième hélice transmembranaire. Les études faites au laboratoire ont permis de démontrer que cette région ne joue pas un rôle critique dans la fonction et les interactions des deux sous-unité du canal quoique la mutation de six acides aminés sur quinze affecte modestement les propriétés du Mg-ADP et des ouvreurs potassiques.

De nombreuses interrogations subsistent encore. La manière dont les changements conformationnels des NBD sont transmis aux TMD reste une énigme. De plus, on ne sait si la régulation de l'ouverture de Kir6.2 par SUR se réalise via les domaines transmembranaires ou via les domaines cytoplasmiques. Le canal  $K_{ATP}$  est la cible de nombreux agents modulateurs, bien plus que la plupart des canaux ioniques, sans doute parce qu'il s'agit d'un complexe de deux protéines très différentes. Comment les régulateurs du canal tels que les nucléotides, les sulfonylurées et les ouvreurs potassiques parviennent à moduler l'activité du canal, est un sujet d'intenses recherches. La résolution de la structure en 3 dimensions de ce complexe hétéro-octamérique serait une étape majeure pour en comprendre son fonctionnement.

Comme annoncé plus haut, l'étude du récepteur des sulfonylurées est aussi un bon modèle pour l'étude des transporteurs ABC. Lorsque les relations structure/fonction de SUR et les éléments nécessaires à son association avec Kir6.2 seront établis, on pourra envisager de coupler d'autres transporteurs ABC au canal Kir6.2 afin d'en faciliter l'étude, et d'étendre ces travaux à d'autres protéines membranaires.

## *Références bibliographiques*



---

*A*

- Aguilar-Bryan L and Bryan J (1996) ATP-sensitive potassium channels, sulfonylureas receptors, and persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes Rev.* **4**:336-46
- Aguilar-Bryan L and Bryan J (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Rev.* **20**:101-35
- Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A and Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of K<sub>ATP</sub> channels. *Physiol Rev.* **78**:227-45
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrerasosa H, Nguy K, Bryan J and Nelson DA (1995) Cloning of the  $\beta$  cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science.* **268**:423-6
- Aleksandrov AA, Chang XB, Aleksandrov L and Riordan JR (2000) The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol.* **528**:259-65
- Aleksandrov AA and Riordan JR (1998) Regulation of CFTR ion channel gating by MgATP. *FEBS Lett.* **431**:97-101
- Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB and Riordan JR (2002) The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol Chem.* **277**:15419-25
- Aleksandrov L, Mengos A, Chang XB, Aleksandrov A and Riordan JR (2001) Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **276**:12918-23
- Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR and Leppert M (1997) Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science.* **277**:1805-7
- Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MSP and Ashcroft FM (2005) Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the K<sub>ATP</sub> channel Kir6.2 subunit. *EMBO J.* **24**:229-39
- Arena JP and Kass RS (1989) Activation of ATP-sensitive K channels in heart cells by pinacidil: dependence on ATP. *Am J Physiol.* **257**:H2092-6
- Arora S, Lapinski PE and Raghavan M (2001) Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:7241-6
- Ashcroft FM (2000) Ion channels and disease, Academic Press, London
- Ashcroft FM and Gribble FM (1998) Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci.* **21**:288-94
- Ashcroft FM and Gribble FM (1999) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia.* **42**:903-19

Ashcroft FM and Gribble FM (2000) New windows on the mechanism of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. *Trends Pharmacol Sci.* **21**:439-45

Ashcroft SJH and Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* **2**:197-214

Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJH and Ashcroft FM (1999) Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K<sub>ATP</sub> channel. *Diabetes.* **48**:1341-7

Aspinwall CA, Brooks SA, Kennedy RT and Lakey JR (1997) Effects of intravesicular H<sup>+</sup> and extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* **272**:31308-14

Assaf SY and Chung SH (1984) Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity. *Nature.* **308**:734-6

Azzaria M, Schurr E and Gros P (1989) Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* **9**:5289-97

## B

Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L and Bryan J (1998) Reconstituted human cardiac K<sub>ATP</sub> channels - Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res.* **83**:1132-43

Babenko AP, Gonzalez G and Bryan J (1999) The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K<sub>ATP</sub> channel closure. *FEBS Lett.* **459**:367-76

Babenko AP, Gonzalez G and Bryan J (2000) Pharmacology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K<sub>ATP</sub> channel isoforms are required for selective interaction with K<sup>+</sup> channel openers. *J Biol Chem.* **275**:717-20

Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD and Paucek P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem.* **276**:33369-74

Bancila V, Cens T, Monnier D, Chanson F, Faure C, Dunant Y and Bloc A (2005) Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat K<sub>ATP</sub> channel. *J Biol Chem.* **280**:8793-9

Bancila V, Nikonenko I, Dunant Y and Bloc A (2004) Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic K<sub>ATP</sub> channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus. *J Neurochem.* **90**:1243-50

Barg S (2003) Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol Toxicol.* **92**:3-13

Baukrowitz T and Fakler B (2000) K<sub>ATP</sub> channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem.* **267**:5842-8

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP and Fakler B (1998) PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels. *Science.* **282**:1141-4

Beaudet L and Gros P (1995) Functional dissection of P-glycoprotein nucleotide-binding domains in chimeric and mutant proteins. Modulation of drug resistance profiles. *J Biol Chem.* **270**:17159-70

Becq F (1996) Ionic channel rundown in excised membrane patches. *Bba-Rev Biomembranes*. **1286**:53-63

Beech DJ, Zhang H, Nakao K and Bolton TB (1993) K-Channel Activation by Nucleotide Diphosphates and Its Inhibition by Glibenclamide in Vascular Smooth Muscle Cells. *Br J Pharmacol*. **110**:573-82

Beguín P, Nagashima K, Nishimura M, Gonoï T and Seino S (1999) PKA-mediated phosphorylation of the human K<sub>ATP</sub> channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J*. **18**:4722-32

Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP and Terzic A (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K<sub>ATP</sub> channel complex. *FASEB J*. **14**:1943-52

Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'-Cochlain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE, Terzic A (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic K-ATP channel gating. *Nat Genet*. **36**:382-7

Bloc A, Cens T, Cruz H and Dunant Y (2000) Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic beta-cells: activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Physiol*. **529**:723-34

Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA and Vijayan M (1971) Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature*. **231**:506-11

Bodzioch M, Orso E, Klucken T, Langmann T, Bottcher L, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ and Schmitz G (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*. **22**:347-51

Branstrom R, Corkey BE, Berggren PO and Larsson O (1997) Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. **272**:17390-4

Branstrom R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren PO and Larsson O (1998) Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem*. **273**:31395-400

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D and Frohlich J (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*. **22**:336-45

Buschard K, Hoy M, Bokvist K, Olsen HL, Madsbad S, Fredman P and Gromada J (2002) Sulfatide controls insulin secretion by modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel activity and Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes*. **51**:2514-21

C

Campbell JD, Koike K, Moreau C, Sansom MSP, Deeley RG and Cole SPC (2004) Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe(594) in transmembrane Helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *J Biol Chem*. **279**:463-8

- Campbell JD, Sansom MSP and Ashcroft FM (2003) Potassium channel regulation - Structural insights into the function of the nucleotide-binding domains of the human sulphonylurea receptor. *Embo Rep.* **4**:1038-42
- Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA and Shyng SL (2001) Defective trafficking and function of K<sub>ATP</sub> channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:2882-7
- Chang G (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: A multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol.* **330**:419-30
- Chang G and Roth CB (2001) Structure of MsbA from *E-coli*: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science.* **293**:1793-800
- Chang XB, Hou YX and Riordan JR (1997) ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem.* **272**:30962-8
- Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL and Quirocho FA (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell.* **12**:651-61
- Chen J, Sharma S, Quirocho FA and Davidson AL (2001) Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:1525-30
- Chen M, Abele R and Tampe R (2004) Functional non-equivalence of ATP-binding cassette signature motifs in the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem.* **279**:46073-81
- Chimienti F, Devergnas S, Favier A and Seve M (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes.* **53**:2330-7
- Choi DW and Koh JY (1998) Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci.* **21**:347-75
- Chutkow WA, Makielski JC, Nelson DJ, Burant CF and Fan Z (1999) Alternative splicing of sur2 exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J Biol Chem.* **274**:13656-65
- Chutkow WA, Pu JL, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF and McNally EM (2002) Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K<sub>ATP</sub> channels. *J Clin Invest.* **110**:203-8
- Chutkow WA, Simon MC, LeBeau MM and Burant CF (1996) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K<sub>ATP</sub> channels. *Diabetes.* **45**:1439-45
- Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L and Bryan J (1997) Association and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *Neuron.* **18**:827-38
- Cook DL and Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature.* **311**:271-3
- Crane A and Aguilar-Bryan L (2004) Assembly, maturation, and turnover of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *J Biol Chem.* **279**:9080-90

Csermely P, Szamel M, Resch K and Somogyi J (1988) Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J Biol Chem.* **263**:6487-90

*D*

Daumke O and Knittler MR (2001) Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains. *Eur J Biochem.* **268**:4776-86

Davies NW, Standen NB and Stanfield PR (1992) The effect of intracellular pH on ATP-dependent potassium channels of frog skeletal muscle. *J Physiol.* **445**:549-68

de Weille JR, Schmid-Antomarchi H, Fosset M and Lazdunski M (1989) Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in insulinoma cells: Activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:2971-5

Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**:1156-66

Derst C, Konrad M, Kockerling A, Karolyi L, Deschenes G, Daut J, Karschin A and Seyberth HW (1997) Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K<sup>+</sup> channel function. *Biochem Biophys Res Commun.* **230**:641-5

D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P and Vivaudou M (1999a) A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by K<sup>+</sup> channel openers. *Mol Pharmacol.* **56**:308-15

D'hahan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A and Vivaudou M (1999b) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:12162-7

Dickinson KEJ, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW and Atwal KS (1997) Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol Pharmacol.* **52**:473-81

Diederichs K, Diez J, Grellner G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonnrhein C, Boos W and Welte W (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.* **19**:5951-61

Dodson G and Steiner D (1998) The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* **8**:189-94

Doring F and Karschin A (2000) Genomic structure and promoter analysis of the rat kir7.1 potassium channel gene (Kcnj13). *FEBS Lett.* **483**:93-8

Dorschner H, Breckard E, Uhde I, Schwanstecher C and Schwanstecher M (1999) Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol.* **55**:1060-6

Douplnik CA, Davidson N and Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol.* **5**:268-77

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT and MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* **280**:69-77



Drain P, Li LH and Wang J (1998)  $K_{ATP}$  channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:13953-8

Dunne MJ, Bullett MJ, Li G, Wollheim CB and Petersen OH (1989) Galanin activates nucleotide-dependent  $K^+$  channels in insulin-secreting cells via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *EMBO J.* **8**:413-20

Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RFL, Johnson PRV, AynsleyGreen A, Lu S, Clement JP, Lindley KJ, Seino S and AguilarBryan L (1997) Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med.* **336**:703-6

ℰ

Elinder CG, Kjellstrom T, Hogstedt C, Andersson K and Spang G (1985) Cancer mortality of cadmium workers. *Br J Ind Med.* **42**:651-5

Escande D, Thuringer D, Leguern S and Caverio I (1988) The potassium channel opener cromakalim (BRL 34915) activates ATP-dependent  $K^+$  channels in isolated cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **154**:620-5

ℱ

Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY and Ruppersberg JP (1996) Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J.* **15**:4093-9

Fan Z and Makielski JC (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem.* **272**:5388-95

Fan Z and Makielski JC (1999) Phosphoinositides decrease ATP sensitivity of the cardiac ATP-sensitive  $K^+$  channel - A molecular probe or the mechanism of ATP-sensitive inhibition. *J Gen Physiol.* **114**:251-69

Ferrer R, Soria B, Dawson CM, Atwater I and Rojas E (1984) Effects of  $Zn^{2+}$  on glucose-induced electrical activity and insulin release from mouse pancreatic islets. *Am J Physiol.* **246**:C520-7

Fetsch EE and Davidson AL (2002) Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:9685-90

Findlay I and Dunne MJ (1986) ATP maintains ATP-inhibited  $K^+$  channels in an operational state. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* **407**:238-40

Furukawa T, Yamane T, Terai T, Katayama Y and Hiraoka M (1996) Functional linkage of the cardiac ATP sensitive  $K^+$  channel to the actin cytoskeleton. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* **431**:504-12

ℳ

Gadsby DC and Nairn AC (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev.* **79**:S77-S107

- Gao M, Cui HR, Loe DW, Grant CE, Almquist KC, Cole SPC and Deeley RG (2000) Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem.* **275**:13098-108
- Garlid KD, Paucek P, Yarovyarovoy V, Sun XC and Schindler PA (1996) The mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* **271**:8796-9
- Gaudet R and Wiley DC (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.* **20**:4964-72
- Ghafghazi T, McDaniel ML and Lacy PE (1981) Zinc-induced inhibition of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes.* **30**:341-5
- Gill DR, Hyde SC, Higgins CF, Valverde MA, Mintenig GM and Sepulveda FV (1992) Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell.* **71**:23-32
- Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM and Herold KC (1998) Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med.* **338**:226-30
- Gold G and Grodsky GM (1984) Kinetic aspects of compartmental storage and secretion of insulin and zinc. *Experientia.* **40**:1105-14
- Gopel SO, Kanno T, Barg S and Rorsman P (2000a) Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol.* **528**:497-507
- Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J and Rorsman P (2000b) Regulation of glucagon release in mouse -cells by K<sub>ATP</sub> channels and inactivation of TTX-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* **528**:509-20
- Gottesman MM and Ambudkar SV (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr.* **33**:453-8
- Gribble FM, Loussouarn G, Tucker SJ, Zhao C, Nichols CG and Ashcroft FM (2000) Novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J Biol Chem.* **275**:30046-9
- Gribble FM, Proks P, Corkey BE and Ashcroft FM (1998a) Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem.* **273**:26383-7
- Gribble FM, Reimann F, Ashfield R and Ashcroft FM (2000) Nucleotide modulation of pinacidil stimulation of the cloned K<sub>ATP</sub> channel Kir6.2/SUR2A. *Mol Pharmacol.* **57**:1256-61
- Gribble FM, Tucker SJ and Ashcroft FM (1997a) The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K<sub>ATP</sub> channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J.* **16**:1145-52
- Gribble FM, Tucker SJ and Ashcroft FM (1997b) The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol.* **504**:35-45
- Gribble FM, Tucker SJ, Haug T and Ashcroft FM (1998b) MgATP activates the beta cell K<sub>ATP</sub> channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:7185-90
- Gribble FM, Tucker SJ, Seino S and Ashcroft FM (1998c) Tissue specificity of sulfonylureas: Studies on cloned cardiac and  $\beta$ -cell K<sub>ATP</sub> channels. *Diabetes.* **47**:1412-8

Grover GJ and Garlid KD (2000) ATP-sensitive potassium channels: A review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol.* **32**:677-95

Gulbis JM and Doyle DA (2004) Potassium channel structures: do they conform? *Curr Opin Struct Biol.* **14**:440-6

Gumina RJ, Pucar D, Bast P, Hodgson DM, Kurtz CE, Dzeja PP, Miki T, Seino S and Terzic A (2003) Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *Am J Physiol.* **284**:H2106-13

## H

Hafkemeyer P, Dey S, Ambudkar SV, Hrycyna CA, Pastan I and Gottesman MM (1998) Contribution to substrate specificity and transport of nonconserved residues in transmembrane domain 12 of human P-glycoprotein. *Biochemistry.* **37**:16400-9

Hambrock A, Löffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y and Quast U (1999) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: Opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol.* **55**:832-40

Hambrock A, Löffler-Walz C, Kurachi Y and Quast U (1998) Mg<sup>2+</sup> and ATP dependence of K<sub>ATP</sub> channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol.* **125**:577-83

Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G and Froguel P (1998) Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia.* **41**:1511-5

Hanley PJ and Daut J (2005) K<sub>ATP</sub> channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* **39**:17-50

Harrison NL and Gibbons SJ (1994) Zn<sup>2+</sup>: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology.* **33**:935-52

Hart LM, Dekker JM, van Haften TW, Ruige JB, Stehouwer CD, Erkelens DW, Heine RJ and Maassen JA (2000) Reduced second phase insulin secretion in carriers of a sulphonylurea receptor gene variant associating with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* **43**:515-9

Hayabuchi Y, Davies NW and Standen NB (2001) Angiotensin II inhibits rat arterial K<sub>ATP</sub> channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase Ca. *J Physiol.* **530**:193-205

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T and Mackinnon R (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J.* **66**:1061-7

HernandezSanchez C, Basile AS, Fedorova I, Arima H, Stannard B, Fernandez AM, Ito Y and Leroith D (2001) Mice transgenically overexpressing sulfonylurea receptor 1 in forebrain resist seizure induction and excitotoxic neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:3549-54

Heron L, Virsolvy A, Peyrollier K, Gribble FM, LeCam A, Ashcroft FM and Bataille D (1998) Human alpha-endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K<sub>ATP</sub> channel: Molecular cloning, expression and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:8387-91

- Higgins CF and Linton KJ (2001) Structural biology - The xyz of ABC transporters. *Science*. **293**:1782-4
- Hilgemann DW and Ball R (1996) Regulation of cardiac  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  exchange and  $\text{K}_{\text{ATP}}$  potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science*. **273**:956-9
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV and Hebert SC (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. **362**:31-8
- Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A and Terzic A (1998) Mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol*. **275**:H1567-76
- Honore E and Lazdunski M (1991) Hormone-Regulated  $\text{K}^+$  Channels in Follicle-Enclosed Oocytes Are Activated by Vasorelaxing  $\text{K}^+$  Channel Openers and Blocked by Antidiabetic Sulfonylureas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:5438-42
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP and Tainer JA (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*. **101**:789-800
- Hou YX, Cui LY, Riordan JR and Chang XB (2000) Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem*. **275**:20280-7
- Hough E, Mair L, Mackenzie W and Sivaprasadarao A (2002) Expression, purification, and evidence for the interaction of the two nucleotide-binding folds of the sulphonylurea receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. **294**:191-7
- Howell GA, Welch MG and Frederickson CJ (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature*. **308**:736-8
- Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I and Gottesman MM (1999) Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry*. **38**:13887-99
- Hu H, Sato T, Seharaseyon J, Liu YG, Johns DC, O'Rourke B and Marban E (1999) Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels and native cardiac mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. *Mol Pharmacol*. **55**:1000-5
- Hu KL, Huang CS, Jan YN and Jan LY (2003) ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C. *Neuron*. **38**:417-32
- Huang CL, Feng SY and Hilgemann DW (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by G beta gamma. *Nature*. **391**:803-6
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN and Jan LY (1995) Evidence that direct binding of G(beta gamma) to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel is important for channel activation. *Neuron*. **15**:1133-43
- Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF and Kim SH (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*. **396**:703-7
- Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko HL, Rahier J, Vauhkonen I, Kere J, Laakso M, Ashcroft F and Otonkoski T (2000) Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. *J Clin Invest*. **106**:897-906

Hutton JC, Penn EJ and Peshavaria M (1983) Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secreting granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J.* **210**:297-305

*J*

Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S and Bryan J (1995a) Reconstitution of I-KATP: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* **270**:1166-70

Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J and Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron.* **16**:1011-7

Inagaki N, Gonoi T and Seino S (1997) Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.* **409**:232-6

Inagaki N, Inazawa J and Seino S (1995b) cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uK<sub>ATP</sub>-1, gene (KCNJ8). *Genomics.* **30**:102-4

Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gonoi T, Horie M, Seino Y, Mizuta M and Seino S (1995c) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem.* **270**:5691-4

Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffman M, Mayorga R, Warrenperry M, Zhang Y, Millns H, Turner R, Province M, Bryan J, Permutt MA and Aguilarbryan L (1996) Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes.* **45**:825-31

Inoue I, Nagase H, Kishi K and Higuti T (1991) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* **352**:244-7

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y and Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem.* **271**:24321-4

Ito K, Suzuki H and Sugiyama Y (2001) Single amino acid substitution of rat MRP2 results in acquired transport activity for taurocholate. *Am J Physiol.* **281**:G1034-43

Ito KI, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG and Cole SPC (2001) Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J Biol Chem.* **276**:15616-24

Iwasaki N, Kawamura M, Yamagata K, Cox NJ, Karibe S, Ohgawara H, Inagaki N, Seino S, Bell GI and Omori Y (1996) Identification of microsatellite markers near the human genes encoding the beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and linkage studies with NIDDM in Japanese. *Diabetes.* **45**:267-9

*J*

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* **417**:515-22

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature.* **423**:33-41

John SA, Monck JR, Weiss JN and Ribalet B (1998) The sulphonylurea receptor SUR1 regulates ATP-sensitive mouse Kir6.2 K<sup>+</sup> channels linked to the green fluorescent protein in human embryonic kidney cells (HEK 293). *J Physiol.* **510**:333-45

Jovanovic A, Alekseev AE and Terzic A (1997) Intracellular diadenosine polyphosphates - A novel family of inhibitory ligands of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Biochem Pharmacol.* **54**:219-25

Julien M, Verrier B, Cerutti M, Chappe V, Gola M, Devauchelle G and Becq F (1999) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells. *J Membr Biol.* **168**:229-39

## K

Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PRV, James RFL, Milla PJ, AynsleyGreen A, Lindley KJ and Dunne MJ (1996) Loss of functional K<sub>ATP</sub> channels in pancreatic beta-cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nat Medicine.* **2**:1344-7

Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ and Hunt JF (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure.* **9**:571-86

Karschin C, Ecke C, Ashcroft FM and Karschin A (1997) Overlapping distribution of K<sub>ATP</sub> channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Lett.* **401**:59-64

Kerr ID (2002) Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Bba-Biomembranes.* **1561**:47-64

Kondo C, Repunte VP, Satoh E, Yamada M, Horio Y, Matsuzawa Y, Pott L and Kurachi Y (1998) Chimeras of Kir6.1 and Kir6.2 reveal structural elements involved in spontaneous opening and unitary conductance of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Receptors Channels.* **6**:129-40

Koster JC, Marshall BA, Ensor N, Corbett JA and Nichols CG (2000) Targeted overactivity of beta cell K<sub>ATP</sub> channels induces profound neonatal diabetes. *Cell.* **100**:645-54

Koyano T, Kakei M, Nakashima H, Yoshinaga M, Matsuoka T and Tanaka H (1993) ATP-regulated K<sup>+</sup> channels are modulated by intracellular H<sup>+</sup> in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol.* **463**:747-66

Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN and Jan LY (1993a) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* **362**:127-33

Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN and Jan LY (1993b) Primary Structure and Functional Expression of a Rat G-Protein-Coupled Muscarinic Potassium Channel. *Nature.* **364**:802-6

Kuo AL, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T and Doyle DA (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science.* **300**:1922-6

## L

- Lee JK, John SA and Weiss JN (1999a) Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1. *J Gen Physiol.* **113**:555-64
- Lee K, Dixon AK, Richardson PJ and Pinnock RD (1999b) Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express  $K_{ATP}$  channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *J Physiol.* **515**:439-52
- Lee K, Ozanne SE, Hales CN and Ashford MLJ (1994) Effects of Chemical Modification of Amino and Sulfhydryl Groups on  $K_{ATP}$  Function and Sulfonylurea Binding in CRI-G1 Insulin-Secreting Cells. *J Membr Biol.* **139**:167-81
- Lesage F, Fink M, Barhanin J, Lazdunski M and Mattei MG (1995) Assignment of human G-protein-coupled inward rectifier  $K^+$  channel homolog GIRK3 gene to chromosome 1q21-q23. *Genomics.* **29**:808-9
- Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S and Thibodeau PH (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* **23**:282-93
- Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K and Bear CE (1996) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **271**:28463-8
- Light P (1996) Regulation of ATP-sensitive potassium channels by phosphorylation. *Bba-Rev Biomembranes.* **1286**:65-73
- Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP and French RJ (2000) Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:9058-63
- Lin YF, Jan YN and Jan LY (2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *EMBO J.* **19**:942-55
- Lindner T, Gragnoli C, Schulze J, Rietzsch H, Petzold C, Schroder HE, Cox NJ and Bell GI (1997) The 31-cM region of chromosome 11 including the obesity gene tubby and ATP-sensitive potassium channel genes, SUR1 and Kir6.2, does not contain a major susceptibility locus for NIDDM in 127 non-Hispanic white affected sibships. *Diabetes.* **46**:1227-9
- Lippiat JD, Albinson SL and Ashcroft FM (2002) Interaction of the cytosolic domains of the Kir6.2 subunit of the  $K_{ATP}$  channel is modulated by sulfonylureas. *Diabetes.* **51**:S377-80
- Liss B, Bruns R and Roeper J (1999) Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of  $K_{ATP}$  channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.* **18**:833-46
- Liu GX, Hanley PJ, Ray J and Daut J (2001a) Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to  $K_{ATP}$  channels in the heart. *Circ Res.* **88**:918-24
- Liu Y, Sato T, O'Rourke B and Marban E (1998) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* **97**:2463-9

- Liu YG, Ren GF, O'Rourke B, Marban E and Seharaseyon J (2001b) Pharmacological comparison of native mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels with molecularly defined surface K<sub>ATP</sub> channels. *Mol Pharmacol*. **59**:225-30
- Locher KP, Lee AT and Rees DC (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*. **296**:1091-8
- Loffler-Walz C and Quast U (1998) Binding of K<sub>ATP</sub> channel modulators in rat cardiac membranes. *Br J Pharmacol*. **123**:1395-402
- Lorenz E and Terzic A (1999) Physical association between recombinant cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits Kir6.2 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol*. **31**:425-34
- Loo TW and Clarke DM (2001) Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem*. **276**:14972-9
- Loussouarn G, Makhina EN, Rose T and Nichols CG (2000) Structure and dynamics of the pore of inwardly rectifying K<sub>ATP</sub> channels. *J Biol Chem*. **275**:1137-44
- Lu T, Nguyen B, Zhang X and Yang J (1999) Architecture of a K<sup>+</sup> channel inner pore revealed by stoichiometric covalent modification. *Neuron*. **22**:571-80

### *M*

- Markworth E, Schwanstecher C and Schwanstecher M (2000) ATP(4-) mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes*. **49**:1413-8
- Martin C, Higgins CF and Callaghan R (2001) The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*. **40**:15733-42
- Martin SC, Yule DI, Dunne MJ, Gallacher and Petersen OH (1989) Vasopressin directly closes ATP-sensitive potassium channels evoking membrane depolarization and an increase in the free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in insulin-secreting cells. *EMBO J*. **8**:3595-9
- Masia R, Enkvetchakul D and Nichols CG (2005) Differential nucleotide regulation of K<sub>ATP</sub> channels by SUR1 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol*. **39**:491-501
- Matsuo M, Kioka N, Amachi T and Ueda K (1999a) ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1. *J Biol Chem*. **274**:37479-82
- Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T and Ueda K (2000) Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *J Biol Chem*. **275**:28757-63
- Matsuo M, Tucker SJ, Ashcroft FM, Amachi T and Ueda K (1999b) NEM modification prevents high-affinity ATP binding to the first nucleotide binding fold of the sulphonylurea receptor, SUR1. *FEBS Lett*. **458**:292-4
- Mikhailov MV, Mikhailova EA and Ashcroft SJH (2001) Molecular structure of the glibenclamide binding site of the beta-cell K<sub>ATP</sub> channel. *FEBS Lett*. **499**:154-60
- Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara Y and Seino S (2001) Roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas. *Diabetes*. **50**:S48-51



Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J and Seino S (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in  $K_{ATP}$  channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**:10402-6

Miki T and Seino S (2005) Roles of  $K_{ATP}$  channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol*. **38**:917-25

Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H and Seino S (2002) Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Medicine*. **8**:466-72

Miki T, Tashiro F, Iwanaga T, Nagashima K, Yoshitomi H, Aihara H, Nitta Y, Gono T, Inagaki N, Miyazaki J and Seino S (1997) Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative  $K_{ATP}$  channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:11969-73

Minor DL, Masseling SJ, Jan YN and Jan LY (1999) Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell*. **96**:879-91

Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF and Thomas PJ (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem*. **277**:21111-4

Moreau C, Gally F, Jacquet-Bouix H and Vivaudou M (2005) The size of a single residue of the sulfonylurea receptor dictates the effectiveness of  $K_{ATP}$  channel openers. *Mol Pharmacol*. **67**:1026-33

Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'Hahan N and Vivaudou M (2000) The molecular basis of the specificity of action of  $K_{ATP}$  channel openers. *EMBO J*. **19**:6644-51

Mourez M, Hofnung M and Dassa E (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J*. **16**:3066-77

Mukai E, Ishida H, Horie M, Noma A, Seino Y and Takano M (1998) The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits  $K_{ATP}$  channels by binding to Kir6.2. *Biochem Biophys Res Commun*. **251**:477-81

ℵ

Nagata K, Nishitani M, Matsuo M, Kioka N, Amachi T and Ueda K (2000) Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem*. **275**:17626-30

Nakamura N, Suzuki Y, Sakuta H, Ookata K, Kawahara K and Hirose S (1999) Inwardly rectifying  $K^+$  channel Kir7.1 is highly expressed in thyroid follicular cells, intestinal epithelial cells and choroid plexus epithelial cells: implication for a functional coupling with  $Na^+, K^+$ -ATPase. *Biochem J*. **342**:329-36

Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J and Standen NB (1990) Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of  $K^+$  channels. *Nature*. **344**:770-3

Nelson MT and Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. **268**:C799-822

Nestorowicz A, Inagaki N, Gono T, Schoor KP, Wilson BA, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Seino S and Permutt MA (1997) A nonsense mutation in the inward

rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes*. **46**:1743-8

Nestorowicz A, Wilson BA, Schoor KP, Inoue H, Glaser B, Landau H, Stanley CA, Thornton PS, Clement JP, Bryan J, Aguilar-Bryan L and Permutt MA (1996) Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Hum Mol Genet*. **5**:1813-22

Nichols CG and Lederer WJ (1990) The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol*. **68**:183-94

Nichols CG and Lopatin AN (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*. **59**:171-91

Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA and Bryan J (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*. **272**:1785-7

Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. **51**:730-50

Nishida M and Mackinnon R (2002) Structural basis of inward rectification: Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 angstrom resolution. *Cell*. **111**:957-65

Noma A (1983) ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*. **305**:147-8

## O

Ohno-Shosaku T, Zunkler BJ and Trube G (1987) Dual effects of ATP on K<sup>+</sup> currents of mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*. **408**:133-8

Otonkoski T, Ammala C, Huopio H, Cote GJ, Chapman J, Cosgrove K, Ashfield R, Huang E, Komulainen J, Ashcroft FM, Dunne MJ, Kere J and Thomas PM (1999) A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes*. **48**:408-15

## P

Partiseti M, Collura V, Agnel M, Culouscou JM and Graham D (1998) Cloning and characterization of a novel human inwardly rectifying potassium channel predominantly expressed in small intestine. *FEBS Lett*. **434**:171-6

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*. **271**:1126-8

Pawagi AB, Wang J, Silverman M, Reithmeier RA and Deber CM (1994) Transmembrane aromatic amino acid distribution in P-glycoprotein. A functional role in broad substrate specificity. *J Mol Biol*. **235**:554-64

Phillips LR and Nichols CG (2003) Ligand-induced closure of inward rectifier Kir6.2 channels traps spermine in the pore. *J Gen Physiol*. **122**:795-804

Poetsch A, Molday LL and Molday RS (2001) The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes. *J Biol Chem*. **276**:48009-16

Pollet JF, Van, Geffel J, Van, Stevens E, Van, Geffel R, Beauwens R, Bollen A and Jacobs P (2000) Expression and intracellular processing of chimeric and mutant CFTR molecules. *Bba-Mol Basis Dis.* **1500**:59-69

Prentki M and Corkey BE (1996) Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes.* **45**:273-83

Prentki M, Tornheim K and Corkey BE (1997) Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia.* **40**:S32-41

Proks P, Antcliff JF, Lippiat J, Gloyn AL, Hattersley AT and Ashcroft FM (2004) Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:17539-44

Proks P and Ashcroft FM (1993) Modification of K<sub>ATP</sub> Channels in Pancreatic beta-Cells by Trypsin. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* **424**:63-72

Proks P and Ashcroft FM (1997) Phentolamine block of K<sub>ATP</sub> channels is mediated by Kir6.2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:11716-20

Prost AL, Bloc A, Hussy N, Derand R and Vivaudou M (2004) Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of K<sub>ATP</sub> channel function. *J Physiol.* **559**:157-67

Q

Quast U (1996) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **354**:213-25

Quast U and Cook NS (1989) In vitro and in vivo comparison of two K<sup>+</sup> channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther.* **250**:261-71

Quayle JM, Nelson MT and Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* **77**:1165-232

Quesada I, Rovira JM, Martin F, Roche E, Nadal A and Soria B (2002) Nuclear K<sub>ATP</sub> channels trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> transients that modulate nuclear function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:9544-9

R

Raab-Graham KF, Cirilo LJ, Boettcher AA, Radeke CM and Vandenberg CA (1999) Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem.* **274**:29122-9

Raab-Graham KF, Radeke CM and Vandenberg CA (1994) Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport.* **5**:2501-5

Reimann F and Ashcroft FM (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol.* **11**:503-8

Reimann F, Gribble FM and Ashcroft FM (2000) Differential response of K<sub>ATP</sub> channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. *Mol Pharmacol.* **58**:1318-25

Reyes CL and Chang G (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP-vanadate and lipopolysaccharide. *Science.* **308**:1028-31

Ribalet B, John SA, Xie L-H and Weiss JN Regulation of the ATP-sensitive K channel Kir6.2 by ATP and PIP<sub>2</sub>. *J Mol Cell Cardiol* (in press)

Riordan JR (1993) The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Annu Rev Physiol.* **55**:609-30

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS and Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* **245**:1066-73

Rissanen J, Markkanen A, Karkkainen P, Pihlajamaki J, Kekalainen P, Mykkanen L, Kuusisto J, Karhapaa P, Niskanen L and Laakso M (2000) Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. *Diabetes Care.* **23**:70-3

Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC and Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem.* **272**:10685-94

Rosenberg MF, Mao QC, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG and Cole SPC (2001) The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) - Crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem.* **276**:16076-82

Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P and Assmann G (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* **22**:352-5

S

Sakura H, Ammala C, Smith PA, Gribble FM and Ashcroft FM (1995a) Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **377**:338-44

Sakura H, Bond C, Warrenperry M, Horsley S, Kearney L, Tucker S, Adelman J, Turner R and Ashcroft FM (1995b) Characterization and variation of a human inwardly-rectifying K-channel gene (KCNJ6): A putative ATP-sensitive K-channel subunit. *FEBS Lett.* **367**:193-7

Sakura H, Wat N, Horton V, Millns H, Turner RC and Ashcroft FM (1996) Sequence variations in the human Kir6.2 gene, a subunit of the beta-cell ATP-sensitive K-channel: No association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia.* **39**:1233-6

Sanchez JA, Gonoi T, Inagaki N, Katada T and Seino S (1998) Modulation of reconstituted ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol.* **507**:315-24

Sanguinetti MC, Scott AL, Zingaro GJ and Siegl PK (1988) BRL 34915 (cromakalim) activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:8360-4

Sato T, O'Rourke B and Marban E (1998) Modulation of mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by protein kinase C. *Circ Res.* **83**:110-4

Sauna ZE and Ambudkar SV (2000) Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:2515-20

- Sauna ZE and Ambudkar SV (2001) Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein - The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem.* **276**:11653-61
- Schmees G, zu, Bentrup KH, Schneider E, Vinzenz D and Ermler U (1999) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the bacterial ATP-binding-cassette (ABC) protein MalK. *Acta Crystallogr D-Biol Cryst.* **55**:285-6
- Schmitt L and Tampe R (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* **12**:754-60
- Schneider E and Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *Fems Microbiol Rev.* **22**:1-20
- Schreiber R, Hopf A, Mall M, Greger R and Kunzelmann K (1999) The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:5310-5
- Schulte U, Hahn H, Wiesinger H, Ruppertsberg JP and Fakler B (1998) pH-dependent gating of ROMK (Kir1.1) channels involves conformational changes in both N and C termini. *J Biol Chem.* **273**:34575-9
- Schwanstecher M, Schwanstecher C, Dickel C, Chudziak F, Moshiri A and Panten U (1994) Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane. *Br J Pharmacol.* **113**:903-11
- Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C and Bryan J (1998) Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J.* **17**:5529-35
- Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan L and Bryan J (2000) Sur1 knockout mice - A model for K<sub>ATP</sub> channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem.* **275**:9270-7
- Seino S, Iwanaga T, Nagashima K and Miki T (2000) Diverse roles of K<sub>ATP</sub> channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes.* **49**:311-8
- Senior AE (1998) Catalytic mechanism of P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand.* **163**:213-8
- Senior AE, al-Shawi MK and Urbatsch IL (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **377**:285-9
- Senior AE and Gadsby DC (1997) ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol.* **8**:143-50
- Seve M, Chimienti F, Jourdan E and Favier A (2001) Le transport et l'homeostasie du zinc cellulaire. *Regard sur la biochimie.* **3**:32-43
- Shapiro AB and Ling V (1998) The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand.* **163**:227-34
- Sharma N, Crane A, Gonzalez G, Bryan J and Aguilar-Bryan L (2000) Familial hyperinsulinism and pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels. *Kidney Int.* **57**:803-8

- Shen WK, Tung RT, Machulda MM and Kurachi Y (1991) Essential role of nucleotide diphosphates in nicorandil-mediated activation of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. A comparison with pinacidil and lemakalim. *Circ Res.* **69**:1152-8
- Shyng SL, Barbieri A, Gumusboga A, Cukras C, Pike L, Davis JN, Stahl PD and Nichols CG (2000) Modulation of nucleotide sensitivity of ATP-sensitive potassium channels by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:937-41
- Shyng SL, Ferrigni T and Nichols CG (1997a) Control of rectification and gating of cloned K<sub>ATP</sub> channels by the Kir6.2 subunit. *J Gen Physiol.* **110**:141-53
- Shyng SL, Ferrigni T and Nichols CG (1997b) Regulation of K<sub>ATP</sub> channel activity by diazoxide and MgADP -Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol.* **110**:643-54
- Shyng SL, Ferrigni T, Shepard JB, Nestorowicz A, Glaser B, Permutt MA and Nichols CG (1998) Functional analyses of novel mutations in the sulfonylurea receptor 1 associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes.* **47**:1145-51
- Shyng SL and Nichols CG (1997) Octameric stoichiometry of the K<sub>ATP</sub> channel complex. *J Gen Physiol.* **110**:655-64
- Shyng SL and Nichols CG (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K<sub>ATP</sub> channels. *Science.* **282**:1138-41
- Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY and Stoffel M (1997) Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:923-7
- Silverman SK, Lester HA and Dougherty DA (1998) Asymmetrical contributions of subunit pore regions to ion selectivity in an inward rectifier K<sup>+</sup> channel. *Biophys J.* **75**:1330-9
- Slomianka L (1992) Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat. *Neuroscience.* **48**:325-52
- Smart TG, Xie X and Krishek BJ (1994) Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol.* **42**:393-41
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ and Hunt JF (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell.* **10**:139-49
- Song DK and Ashcroft FM (2001) ATP modulation of ATP-sensitive potassium channel ATP sensitivity varies with the type of SUR subunit. *J Biol Chem.* **276**:7143-9
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD and Ashford MLJ (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature.* **390**:521-5
- Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH and Ashford MLJ (2000) Insulin activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci.* **3**:757-8
- Spruce AE, Standen NB and Stanfield PR (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature.* **316**:736-8
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E and Poncz M (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in

infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med.* **338**:1352-7

Stirling B, Cox NJ, Bell GI, Hanis CL, Spielman RS and Concannon P (1995) Linkage studies in NIDDM with markers near the sulphonylurea receptor gene. *Diabetologia.* **38**:1479-81

Stoffel M, Espinosa R 3rd, Powell KL, Philipson LH, Le Beau MM and Bell GI (1994) Human G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK1) gene (KCNJ3): localization to chromosome 2 and identification of a simple tandem repeat polymorphism. *Genomics.* **21**:254-6

Sturgess NC, Ashford ML, Cook DL and Hales CN (1985) The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet.* **8453**:474-5

Sui JL, PetitJacques J and Logothetis DE (1998) Activation of the atrial K-ACh channel by the beta gamma subunits of G proteins or intracellular Na<sup>+</sup> ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:1307-12

Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S and Takata K (1997) Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* **241**:693-7

Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, OhmotoSekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E and Nakaya H (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res.* **88**:570-7

∫

Taguchi Y, Yoshida A, Takada Y, Komano T and Ueda K (1997) Anti-cancer drugs and glutathione stimulate vanadate-induced trapping of nucleotide in multidrug resistance-associated protein (MRP). *FEBS Lett.* **401**:11-4

Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T and Ueda K (2000) Direct photoaffinity labeling of Kir6.2 by [gamma-(32)P]ATP-[gamma]4-azidoanilide. *Biochem Biophys Res Commun.* **272**:316-9

Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amachi T and Ueda K (1999) Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by 8-azido-ATP. *J Biol Chem.* **274**:3931-3

Tanizawa Y, Matsuda K, Matsuo M, Ohta Y, Ochi N, Adachi M, Koga M, Mizuno S, Kajita M, Tanaka Y, Tachibana K, Inoue H, Furukawa S, Amachi T, Ueda K and Oka Y (2000) Genetic analysis of Japanese patients with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy - Nucleotide-binding fold-2 mutation impairs cooperative binding of adenine nucleotides to sulfonylurea receptor 1. *Diabetes.* **49**:114-20

Terzic A, Jahangir A and Kurachi Y (1995) Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: Regulation by intracellular nucleotides and K<sup>+</sup> channel-opening drugs. *Am J Physiol.* **269**:C525-45

Terzic A and Kurachi Y (1996) Actin microfilament disrupters enhance K<sub>ATP</sub> channel opening in patches from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol.* **492**:395-404

Terzic A, Tung RT, Inanobe A, Katada T and Kurachi Y (1994) G proteins activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by antagonizing ATP-dependent gating. *Neuron.* **12**:885-93

Terzic A and Vivaudou M (2001) Molecular Pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: How and Why? in Potassium channels in Cardiovascular Biology (Archer SL and Rusch NJ eds) pp 257-277, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Thomas P, Ye YY and Lightner E (1996a) Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet.* **5**:1809-12

Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF and Bryan J (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science.* **268**:426-9

Thomas PM, Wohllk N, Huang E, Kuhnle U, Rabl W, Gagel RF and Cote GJ (1996b) Inactivation of the first nucleotide-binding fold of the sulfonylurea receptor, and familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am J Human Genetics.* **59**:510-8

Trapp S, Haider S, Jones P, Sansom MSP and Ashcroft FM (2003) Identification of residues contributing to the ATP binding site of Kir6.2. *EMBO J.* **22**:2903-12

Trapp S, Proks P, Tucker SJ and Ashcroft FM (1998) Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *J Gen Physiol.* **112**:333-49

Trube G and Hescheler J (1984) Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* **401**:178-84

Trube G, Rorsman P and Ohno-Shosaku T (1986) Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* **407**:493-9

Tucker SJ and Ashcroft FM (1999) Mapping of the physical interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2. *J Biol Chem.* **274**:33393-7

Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F and Ashcroft FM (1998) Molecular determinants of K<sub>ATP</sub> channel inhibition by ATP. *EMBO J.* **17**:3290-6

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S and Ashcroft FM (1997) Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature.* **387**:179-83

Tucker SJ, James MR and Adelman JP (1995) Assignment of K<sub>ATP</sub>-1, the cardiac ATP-sensitive potassium channel gene (KCNJ5), to human chromosome 11q24. *Genomics.* **28**:127-8

U

Ueda K, Inagaki N and Seino S (1997) MgADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem.* **272**:22983-6

Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S and Amachi T (1999) Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:1268-72

Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C and Schwanstecher M (1999) Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem.* **274**:28079-82



Urbatsch IL, Sankaran B, Weber J and Senior AE (1995) P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J Biol Chem.* **270**:19383-90

U

Vallee BL and Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* **73**:79-118

van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, Sardini A, Konings WN and Higgins CF (1998) A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature.* **391**:291-5

van Veen HW, Margolles A, Muller M, Higgins CF and Konings WN (2000) The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.* **19**:2503-14

Vanoye CG, Macgregor GG, Dong K, Tang LQ, Buschmann AS, Hall AE, Lu M, Giebisch G and Hebert SC (2002) The carboxyl termini of K<sub>ATP</sub> channels bind nucleotides. *J Biol Chem.* **277**:23260-70

Velarde G, Ford RC, Rosenberg MF and Powis SJ (2001) Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single particle image analysis. *J Biol Chem.* **276**:46054-63

Verkarre V, Fournet JC, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM and Junien C (1998) Paternal mutation of the sulfonylurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest.* **102**:1286-91

Virsolvy-Vergine A, Bruck M, Dufour M, Cauvin A, Lupo B and Bataille D (1988) An endogenous ligand for the central sulfonylurea receptor. *FEBS Lett.* **242**:65-9

Vivaudou M and Forestier C (1995) Modification by protons of frog skeletal muscle K<sub>ATP</sub> channels: effects on ion conduction and nucleotide inhibition. *J Physiol.* **486**:629-45

W

Wada Y, Yamashita T, Imai K, Miura R, Takao K, Nishi M, Takeshima H, Asano T, Morishita R, Nishizawa K, Kokubun S and Nukada T (2000) A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by G-protein beta gamma-subunits. *EMBO J.* **19**:4915-25

Wang CM, Wang K, Wang WX, Cui YJ and Fan Z (2002) Compromised ATP binding as a mechanism of phosphoinositide modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett.* **532**:177-82

Wibrand F, Honore E and Lazdunski M (1992) Opening of Glibenclamide-Sensitive K<sup>+</sup> Channels in Follicular Cells Promotes Xenopus Oocyte Maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:5133-7

X

Xie LH, Horie M and Takano M (1999) Phospholipase C-linked receptors regulate the ATP-sensitive potassium channel by means of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:15292-7

Xie XM and Smart TG (1991) A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature*. **349**:521-4

Xu HX, Cui NR, Yang ZJ, Wu JP, Giwa LR, Abdulkadir L, Sharma P and Jiang C (2001) Direct activation of cloned K<sub>ATP</sub> channels by intracellular acidosis. *J Biol Chem*. **276**:12898-902

## Y

Yamada K, Ji JJ, Yuan HJ, Miki T, Sato S, Horimoto N, Shimizu T, Seino S and Inagaki N (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science*. **292**:1543-6

Yamada M, Inanobe A and Kurachi Y (1998) G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev*. **50**:723-60

Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y and Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol*. **499**:715-20

Yan FF, Lin CW, Weisiger E, Cartier EA, Taschenberger G and Shyng SL (2004) Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem*. **279**:11096-105

Yang K, Fang K, Fromondi L and Chan KW (2005) Low temperature completely rescues the function of two misfolded K ATP channel disease-mutants. *FEBS Lett*. **579**:4113-8

Yano H, Philipson LH, Kugler JL, Tokuyama Y, Davis EM, Le Beau MM, Nelson DJ, Bell GI and Takeda J (1994) Alternative splicing of human inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel ROMK1 mRNA. *Mol Pharmacol*. **45**:854-60

Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Seki T and Sperelakis N (1997) Disruption of actin cytoskeleton attenuates sulfonylurea inhibition of cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*. **434**:203-5

Yuan H, Michelsen K and Schwappach B (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol*. **13**:638-46

Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ and Hunt JF (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette - Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem*. **276**:32313-21

## Z

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN and Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K<sub>ATP</sub> channels. *Neuron*. **22**:537-48

Zhou J and Adams JA (1997) Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*. **36**:15733-8

Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP and Terzic A (2001) Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *Neuron*. **31**:233-45

Zingman LV, Hodgson DM, Bienengraeber M, Karger AB, Kathmann EC, Alekseev AE and Terzic A (2002) Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonylurea receptor in gating ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem.* **277**:14206-10

# *Remerciements*



Je tiens à remercier Florent Guillain de m'avoir accueillie dans son laboratoire flambant neuf du bâtiment K et pour l'ambiance très conviviale qui y règne...

...un grand merci à Michel Vivaudou pour sa disponibilité, son amour du travail bien fait, ses nombreuses compétences (en particulier pour tous les bugs informatiques), sa patience et sa confiance... merci de m'avoir permis de présenter mes travaux à des congrès scientifiques, ainsi que de toucher à l'enseignement...

...merci à tous les membres de l'équipe ABC, passés, présents, et qui sait peut-être futurs... Christophe, Hélène et Anne-Lise, tous trois ayant contribué à ma domestication des canaux  $K_{ATP}$  exprimés dans l'ovocyte de Xénope... à Renaud, mon « post-doc préféré », avec qui j'ai particulièrement apprécié de partager mon bureau... à Babeth, pour ses nombreuses initiations, tant en biologie moléculaire qu'en VTT... à Jean, pour son enthousiasme et sa persévérance, tant pour les manips que pour le ski sous toutes ses formes... à Audrey et Mathilde pour leur bonne humeur... à Ophélie et Emilie pour leurs petites mains souvent bien précieuses... à Iulia et Eric, les derniers venus, toujours les bienvenus...

...mille mercis à Jean-Luc pour ses petits conseils stratégiques et son inégalable maîtrise de la langue française pour la relecture de ce manuscrit... à Michèle pour son attention et sa gentillesse...

...merci à l'équipe des foldingues pour tous les bons fous rires et autres moments heureux passés dans le « bureau-aquarium », à l'équipe ATPase pour leurs conseils précieux et à l'équipe GTPase qui contribue à renforcer les effectifs féminins du labo...

...merci à tous ceux que j'oublie, Jean, Damien, Isa, Caro, Béa, David pour leur soutien dans les moments les plus durs...

...et the last but not the least, un énorme merci à Arnaud qui a toujours su être présent et qui m'a fait découvrir tant de choses...